



## **FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología**

# **ALTERACIONES en el METABOLISMO de la GLUCOSA en estado de RESISTENCIA a INSULINA y DIABETES TIPO 2: ACCIÓN NORMALIZADORA del GLP-1 y de la Exendina-4**

Trabajo presentado por **Paola Moreno Pérez**,  
Licenciada en CC. Biológicas, para optar al grado de Doctor

**Director:** Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo Molina

**Ponente:** Prof. Inmaculada Canal Beltrán

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>PROPÓSITO .....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>1. MUESTRAS de ESTUDIO .....</b>	<b>20</b>
1.1. Modelo experimental de resistencia a insulina (RI).....	20
1.2. Modelo experimental de diabetes tipo 2 (DT2).....	20
<b>2. AGENTES en ESTUDIO .....</b>	<b>21</b>
<b>3. TRATAMIENTO de la RATA con GLP-1 y Ex-4 .....</b>	<b>21</b>
<b>4. DETERMINACIÓN de PARÁMETROS en PLASMA .....</b>	<b>22</b>
<b>5. ESTUDIO de actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR .....</b>	<b>23</b>
5.1. PI3K .....	24
i) Inmunoprecipitación .....	24
ii) Formación de PIP <sub>3</sub> .....	25
iii) Extracción y separación de lípidos .....	26
5.2. MAPKs .....	28
i) Western blot .....	28
<b>6. EXPRESIÓN de GLUCOTRANSPORTADORES .....</b>	<b>28</b>
6.1. ARNm .....	28
i) Aislamiento de ARN .....	29
ii) Síntesis de ADNc .....	30
iii) RCP-TR .....	30
6.2. Proteína .....	31
i) Preparación de membranas .....	31
<b>7. AISLAMIENTO de ADIPOCITOS .....</b>	<b>32</b>
<b>8. TRANSPORTE de GLUCOSA .....</b>	<b>34</b>
8.1. Músculo esquelético .....	34
8.2. Adipocitos aislados .....	36
<b>9. MEDIDA de CONTENIDO en GLUCÓGENO .....</b>	<b>37</b>

<b>10. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA a .....</b>	<b>37</b>
<b>11. INFORMACIÓN de los RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>1. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 en la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2: <i>parámetros en plasma</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>2. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-2, en el HÍGADO de la rata NORMAL y RESISTENTE a INSULINA .....</b>	<b>40</b>
<b>3. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el CONTENIDO de GLUCÓGENO, en el HÍGADO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>42</b>
<b>4. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el HÍGADO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>5. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el MÚSCULO de la rata NORMAL y RESISTENTE a INSULINA .....</b>	<b>49</b>
<b>6. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA y actividad GLUCÓGENO SINTASA a, en el MÚSCULO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>53</b>
<b>7. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el MÚSCULO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>55</b>
<b>8. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el TEJIDO ADIPOSO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>61</b>
<b>9. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA, en el ADIPOCITO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>63</b>
<b>10. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el TEJIDO ADIPOSO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2 .....</b>	<b>65</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>81</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>96</b>

## INTRODUCCIÓN

Hay constancia de que ya en el antiguo Egipto (III Dinastía) se había identificado una enfermedad manifestada por gran excreción de orina –papiro de Ebers, s. XVI a.C., **Fig. 1**–; no obstante, el termino **diabetes** –atribuido a Demetrio de Apamaia– no aparece hasta el siglo II a.C., y procede del sustantivo griego *diabeinein*, con el que se describía un círculo de doble sifón para el paso de fluidos. La primera enumeración exhaustiva de los síntomas –sed intolerable, ardor en el intestino y tránsito rápido de líquidos– la proporciona Aretaios de Capadocia (81-138 d.C.) quién, además, menciona dos estadios de la enfermedad: crónico y agudo-fatal. Sin embargo, su origen era un enigma sobre el que se proponían razones de índole tan diversa como la adjudicación al riñón o al estómago de responsabilidad fundamental, o la de la corrupción de fluidos resultante de una combinación desordenada de sulfuro y sales en la sangre (Paracelsus, 1493-1541); lógicamente, también se indicaba todo tipo de terapias. A pesar de que se iban acuñando nombres específicos, siempre descriptivos de síntomas relacionados, la primera distinción entre diabetes insípida y diabetes *mellitus* fue establecida por W. Cullen [1769] y J.P. Frank [1794] en el siglo XVIII, después de que T. Willis [1674], que sufrió la enfermedad, informara sobre el sabor dulce -*quasi melle aut saccharo inbuta*- de la orina diabética; tras ésta, fueron apareciendo otras clasificaciones como la de *diabète grass* y *diabète maigre* [Lancereaux, 1880], que seguían reclamando distintas formas de tratamiento.

En 1838, Apollinaire Bouchardata [1851] confirma químicamente la presencia de azúcar en la orina del diabético, cuando poco antes el químico italiano Ambrosioni [1835] había proporcionado la prueba de su existencia en la sangre de estos pacientes. Así, su mera presencia en la circulación estaba siendo considerada como un factor patológico, o accidental, hasta que Claude



**Figura 1**

Bernard afirma, en su famosa *Leçons sur le diabète* [1877], que la glucemia -azúcar en la sangre- es independiente de la alimentación, que está presente en el hombre y en otros animales tanto saciados como en ayunas, y que constituye en sí misma una característica normal, siendo la verdadera anomalía, en contra de lo hasta entonces establecido, tanto su exceso como su ausencia.

El siglo XIX proporciona un cambio de orientación y un avance determinante en el conocimiento de la enfermedad. Por un lado, Paul Langerhans (**Fig. 1**), con su tesis doctoral en 1869 (**Fig. 1**), describe la anatomía e histología de células del islote pancreático, cuya función decía desconocer; Claude Bernard, por otro, mostraba la conexión entre el sistema nervioso central y la diabetes [1849]. Además, Minkowski y von Mering [1889] originan, por extirpación del páncreas, una diabetes artificial en el perro.

Desde el inicio del siglo XX, el convencimiento de que los islotes de Langerhans producían y secretaban una hormona que aliviaba los síntomas de la diabetes, era firme; pero la prueba indiscutible de la existencia en el páncreas de un principio activo estrechamente relacionado -**insulina**-, fue proporcionada por Banting y Best en 1922, al obtener un extracto pancreático que, inyectado, revirtió, en el perro y en el hombre, el cuadro clínico diabético. Muy pronto a partir de entonces, se dispuso de extractos de insulina para uso terapéutico, preparados primero por los laboratorios Eli Lilly en EE.UU. (**Fig. 1**) y, poco después, por los Novo en Europa

Cada tejido y órgano de los mamíferos tiene una función especializada, que se hace patente en su anatomía y actividad. El músculo esquelético, por ejemplo, utiliza energía metabólica para generar movimiento; el tejido adiposo almacena y libera grasa, que sirve después como combustible; el cerebro bombea iones para producir señales eléctricas; y el hígado, que juega un papel central, procesa y distribuye nutrientes a través de la circulación. Pero la coordinación del metabolismo entre los distintos órganos ocurre mediante señalización hormonal y neuronal, es decir, las células individuales de un tejido captan los cambios de circunstancia en el organismo, y responden secretando un mensajero químico extracelular. En el caso de las células endocrinas, éstas secretan hormonas, nombre derivado del griego *horman*, que significa agitar o excitar. Tanto en el caso de las hormonas como en el de los neurotransmisores, estos mensajeros químicos extracelulares llegan a otra célula, se

unen a un receptor específico de la molécula, y ponen en marcha la actividad de esta segunda célula.

En el hombre, en concreto, y especialmente en los procesos metabólicos del hígado, músculo y tejido adiposo, la regulación de los niveles de glucosa circulantes, que deben mantenerse próximos a 4,5 mM, requiere de la acción combinada de tres hormonas fundamentales –insulina, glucagón y epinefrina–. Cuando la concentración de glucosa en sangre es más alta de lo necesario, la insulina produce la señal en los tejidos correspondientes, para que el azúcar sea retirada de la circulación y convertida en producto de almacenamiento –glucógeno y triacilglicerol–; el glucagón señala sobre una glucemia demasiado baja, y el/los tejido/s responden produciendo glucosa bien por ruptura de glucógeno o por gluconeogénesis, u oxidando grasas para reducir el consumo de la hexosa; y la epinefrina prepara al músculo, pulmón y corazón, para su actividad.

La insulina es secretada bajo el estímulo de la glucosa sanguínea –fundamentalmente–, y regula el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos en numerosos tejidos; su concentración en sangre está en función de la de glucosa, y constituye el mensajero hormonal de la disponibilidad del azúcar. Esta hormona, que estimula el transporte de glucosa en el músculo y en el adipocito [Cushman y Warzala, 1980; Suzuki y Kono, 1993], se convierte en el elemento principal del mecanismo controlador del nivel de azúcar en la sangre, conduciendo su efecto metabólico, en conjunto, a la regulación de la utilización y acumulación de glucosa por parte de los tejidos. Su importancia fisiológica es tal, que ha sido una de las proteínas más estudiadas; de hecho, fue la primera en ser secuenciada [Sanger, 1959], la primera en ser sintetizada químicamente [Katsoyannis y col., 1963], y también la primera proteína recombinante para uso clínico [Goeddel y col., 1979]. El primer paso en la acción de la insulina, una vez secretada, es la unión, en el tejido diana, a su receptor de membrana, cuya estructura se conoce desde 1985 [Ebina y col., 1985; Ullrich y col., 1985]. Este receptor es una glucoproteína integrada en la membrana celular, constituida por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  (**Fig. 2**), unidas entre sí por enlaces covalentes de tipo disulfuro. En esta unión se forman heterodímeros  $\alpha$ – $\beta$  que, a su vez, están asociados por el mismo tipo de puentes disulfuro, constituyendo un tetrámero  $\alpha_2$ – $\beta_2$  [Czech, 1985]. El receptor de insulina se expresa en casi todos los



la hexosa se produce tras la translocación desde el interior celular a la membrana plasmática, de vesículas membranosas con alto contenido en GLUT-4 [Zorzano y col., 1989], deteniéndose el proceso cuando el transportador se interna de nuevo [Cushman y Wardzala, 1980]. La insulina [Guma y col., 1991], la contracción muscular [Lund y col., 1995] o su estimulación eléctrica [Roy y col., 1997], la glucosa [Goodyear y col., 1996], y agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas [Pulido y col., 1996], inducen la translocación del glucotransportador. En este efecto de la insulina, promotor de captación de glucosa por células sensibles a la hormona, parece ser clave un incremento en la actividad de la PI3K [Shepherd y col., 1998]; pero aunque suficiente para su inicio, no se consigue con ello una activación completa del transporte [Frevort y Kahn, 1997], por lo que algunos autores creen en la necesaria participación de una segunda ruta de señalización [Isakoff y col., 1995]. Así, aunque el mecanismo de translocación del GLUT-4 es aún desconocido, sí se ha demostrado que la PI3K puede activar otros enzimas como la PKB o la PKC [Litherland y col., 2001]; además, moléculas como la fosfolipasa C, la isoforma 1 de la fosfolipasa D o la Rab4 [Imamura y col., 2003], parecen también estar involucradas en el proceso.

El **GLUT-2** es la isoforma mayoritaria de los glucotransportadores en el hígado, en la célula  $\beta$  pancreática, en el epitelio luminal del riñón y en el intestino [Thorens, 1992a; Thorens y col., 1988]. La homología del GLUT-2 humano con el de la rata es de un 82%, valor aceptable para la distancia filogenética que separa las dos especies [Kayano y col., 1988]; su  $K_m$  (42 mM) es la mayor de todos los transportadores de glucosa [Gould y col., 1991], lo que unido a la presencia de glucoquinasa -con una  $K_m$  también suprafisiológica- en el hígado y en la célula  $\beta$ , convierte estos tejidos en altamente sensibles a glucosa [Unger, 1991]. Por ello, se piensa que, posiblemente, el GLUT-2 está involucrado en la patogénesis de ciertas formas de diabetes [Johnson y col., 1990; Orci y col., 1990a; Orci y col., 1990b; Thorens y col., 1990a]. Algunos resultados de estudios, realizados en la rata, indican que el ARNm del GLUT-2 de la célula  $\beta$  aumenta directamente con la concentración de glucosa en sangre [Chen y col., 1990], mientras que otros sostienen lo contrario [Koranyi y col., 1992]. También es contradictoria la información obtenida en el hígado del modelo de diabetes tipo 1 inducido por tratamiento con estreptozotocina en la rata adulta, en el que se ha detectado desde valores normales [Thorens y col., 1990a; Tal y col., 1991] hasta una reducción [Dombrowski y



col., 1996] o incluso aumento [Burcelin y col., 1992; Brichard y col.; 1993a; Brichard y col., 1993b; Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b], bien de los niveles de proteína del glucotransportador, los de su ARNm, o ambos; en caso de aumento, el tratamiento con florizina [Brichard y col.; 1993b], vanadato [Brichard y col., 1993a] o insulina [Burcelin y col., 1992; Villanueva-Peñacarrillo, 2001b] parecen normalizar esas alteraciones.

Tres son las condiciones fundamentales que conducen a una acumulación deficiente de glucosa en la célula: el ayuno, la diabetes *mellitus*, y una dieta rica en grasas y pobre en carbohidratos; en la diabetes –disminución parcial o absoluta de insulina o acción defectuosa de ésta–, el mecanismo de acceso de la hexosa a la célula está alterado. No obstante, la manifestación de **diabetes** procede de muchas más razones que la mera carencia de insulina –tipo 1–; de hecho, la **diabetes tipo 2**, en la que su ausencia absoluta no es el problema, se caracteriza, en general, por el fracaso de la célula  $\beta$  para responder y compensar la resistencia a la acción de la hormona en tejidos participantes en el metabolismo de la glucosa, lo que aboca, con el tiempo, a la disfunción total y apoptosis de la propia célula –diabetes tipo 1–. La diabetes tipo 2 es la enfermedad metabólica más frecuente, además de la primera causa de ceguera, insuficiencia renal y enfermedad vascular periférica en el adulto. La resistencia a insulina predice su futuro desarrollo, y hay factores genéticos que determinan el riesgo de padecerla; sobre ello, además, se ha puesto de manifiesto la responsabilidad de alteraciones en lo que se conoce de la vía de señalización celular de la hormona (**Fig. 2**). De todas formas, su complejidad en células sensibles a insulina está por determinar y, por tanto, no se conocen del todo los factores origen de los defectos en su acción o secreción, que abocan al individuo a un estado diabético. La sobreingestión de carbohidratos y grasas, en combinación con una vida sedentaria, es causa de obesidad que, con frecuencia, y en un periodo variable en función del individuo, conduce a la aparición de resistencia a la insulina, diabetes y valores alterados de adipocitocinas, lo último relacionado con un incremento en factores de riesgo cardiovascular [Torres y col., 2008].

El síndrome de **resistencia a la insulina** está caracterizado por un deterioro en la capacidad de respuesta de la célula a la hormona que, por tanto, no sólo tiene como resultado una captación de glucosa deficiente, sino que provoca un exceso en la secreción de insulina. Pero la célula  $\beta$  no puede sostener indefinidamente una

hiperespuesta con el fin de compensar la resistencia a la hormona, por lo que, con el tiempo, ello aboca a una disfunción, primero, y ulterior muerte –diabetes tipo 1– de la célula [Beck-Nielsen y Groop, 1994; Turner y Clapham, 1998]. La resistencia a la insulina, con un estado de hiperinsulinemia sostenida, está ya presente en personas, generalmente obesas, décadas antes de que se manifieste una diabetes tipo 2 [Lillioja y col., 1993; Despres y col., 1996; Smith, 1996].

Hoy día, dos son las teorías que, mayoritariamente, tienden a explicar la aparición de resistencia a insulina y diabetes tipo 2. Una está basada en su posible origen inmune, que adjudica a la aparición o incremento de mediadores inflamatorios la responsabilidad e influencia perniciosa sobre el equilibrio entre el proceso de metabolización del azúcar –regulado por insulina y otras hormonas– y la propia función de la célula  $\beta$ . La segunda teoría es conceptualmente metabólica, y toma en consideración que la función del tejido se ve directamente afectada por la acción tóxica de un exceso de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y triglicéridos, probablemente mediado por un incremento en el estrés oxidativo [Jansson y col., 1995; Evans y col., 2003].

Se ha postulado que la resistencia a la insulina se inicia en el tejido adiposo, el cual tendría un papel señero en la inducción y desarrollo del problema en el hígado y músculo [Smith, 2002]. Si tomamos como premisa que el tejido adiposo sea en realidad un órgano endocrino más [Kershaw y Flier, 2004], que en determinadas circunstancias puede liberar un exceso de ácidos grasos libres (AGL), angiotensina II y adipoquinas, estamos frente a factores potencialmente desestabilizantes del metabolismo. Por ejemplo, la concentración desproporcionada de AGL en sangre inhibe la captación de glucosa por el músculo [Shipp y col., 1961; Belfort y col., 2005], lo que unido a la de angiotensina II, provoca daños en el páncreas; y a pesar de que la célula  $\beta$  conserva actividad, ésta no es suficiente para contrarrestar la hiperglucemia originada –insulinorresistencia–. A ello hay que añadir el hecho de que la angiotensina II es, *per se*, un vasoconstrictor que aumenta la presión arterial; además, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y otras citoquinas (interleuquinas), en exceso, no sólo promueven procesos inflamatorios que reducen, aún más, la eficacia de la insulina, sino que, también, generan hipertensión. El exceso de glucosa y AGL circulantes son la señal para que el hígado sintetice triglicéridos que, finalmente, resultan en un aumento en la

relación LDL/HDL [Jandeleit-Dahm y col., 2005; Syvanne y Taskine, 1997]. Esto, en su conjunto, se conoce actualmente como *síndrome metabólico* [Opie, 2007], y su diagnóstico clínico se basa en valores aumentados de grasa abdominal, glucemia en ayunas, presión arterial, relación HDL/LDL y triglicéridos.

Pero si bien las causas concretas que llevan a un individuo en particular a sufrir resistencia a la insulina, y que lo aboca a un estado diabético, son desconocidas, sí se ha avanzado significativamente en el desarrollo de fármacos destinados a aquéllos en los que una ausencia de función de la célula  $\beta$  no es el problema, y que a través de un mecanismo u otro restablecen o mejoran, al menos temporalmente, la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, durante mucho tiempo, ninguno de esos agentes disponibles ha sido capaz de corregir directamente, o soslayar, la resistencia a la insulina. Y en la búsqueda de un tratamiento subsanador del problema, la atención se ha dirigido, desde hace ya unos años, hacia las tiazolidinedionas, los rexinoides, el GLP-1, y a un homólogo de éste, la exendina-4 (Ex-4).

Las tiazolidinedionas, o glitazonas, estimuladoras del receptor nuclear gamma activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR- $\gamma$ ), sí mejoran el control glucémico y reducen los niveles plasmáticos de insulina, triglicéridos y ácidos grasos [Einhorn y col., 2004; Rangwala y Lazar, 2004]; sin embargo, su probada implicación en numerosas muertes por fallo hepático ha obligado la prohibición de su uso terapéutico [Gale, 2006]. Los rexinoides, análogos de ácido retinoico, potencian la acción de la insulina tras su unión al receptor X retinoide –cofactor esencial en la función de los PPARs [Villarroya y col., 2004]–. Frente a estos agentes, el GLP-1 tiene unas características de secreción y acción que merecen el interés puesto en un estudio con fines terapéuticos, principalmente de la diabetes tipo 2 [Deacon, 2004].

El **GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*)** se origina en el proceso post-traducción de la molécula del proglucagón en las células L del intestino. La molécula del proglucagón humano, deducida de la de los nucleótidos del gen [Bell y col., 1983a], y también la de otros mamíferos [Bell y col., 1983a, 1983b; López y col., 1983], tiene 180 aminoácidos, veinte de los cuales forman el péptido señal, y el resto, la prohormona. Pero la cualidad de los péptidos originados del proglucagón depende del tejido de traducción [Mojsov y col., 1986], páncreas o intestino. En las células  $\alpha$  del páncreas, se produce, predominantemente, el fragmento 1-30, llamado también GRPP –péptido pancreático

relacionado con la glicentina [Thim y Moody, 1982]–, el 33-61 o glucagón, el 64-69 [Yanaihara y col., 1985], el 1-61 [Baldissera y Holst, 1986], y la porción carboxi-terminal 72-158, denominada MPGF (*Major Proglucagon Fragment*). En las células L del intestino, del proglucagón se origina, fundamentalmente, la fracción 1-69, llamada glicentina [Thim y Moody, 1982], la 33-69 u oxintomodulina [Bataille y col., 1982], la 78-108 o GLP-1(7-37) –cuya forma amidada (7-36amida) se ha denominado GLP-1–, y el GLP-2 o proglucagón 126-158 [Mojsov y col., 1986; Ørskov y col., 1986]. La glicentina y la oxintomodulina corresponden a las fracciones I y II, respectivamente, del GLI (*glucagon-like immunoreactivity*) de extractos de intestino [Valverde y col., 1970], que se liberan tras la administración, exclusivamente oral, de glucosa [Unger y col., 1968]. Por otro lado, tanto en las células  $\alpha$  del páncreas como en las L enteroendocrinas, se expresa el factor de transcripción cdx 2/3, que se encarga de la regulación del gen del proglucagón [Jin y Drucker, 1996; Laser y col., 1996]. En el intestino, el origen del GLP-1 parece estar condicionado a la expresión específica de tejido de las convertasas de prohormonas (PCs) en las células enteroendocrinas. Mientras que tanto la PC1 como la PC2 escinden el proglucagón para generar MPGF, glicentina y oxintomodulina [Rothenberg y col., 1995; Dhavantani y col., 1996], sólo la PC1 parece ser el enzima responsable de la producción de GLP-1 y GLP-2 [Dhavantani y col., 1996].

Pero lo que da valor al GLP-1 es su calidad de incretina, es decir, el que su liberación aumente tras la absorción de nutrientes, tras lo cual actúe directamente en el páncreas, estimulando su secreción endocrina, concretamente la de insulina (**Fig. 3**).

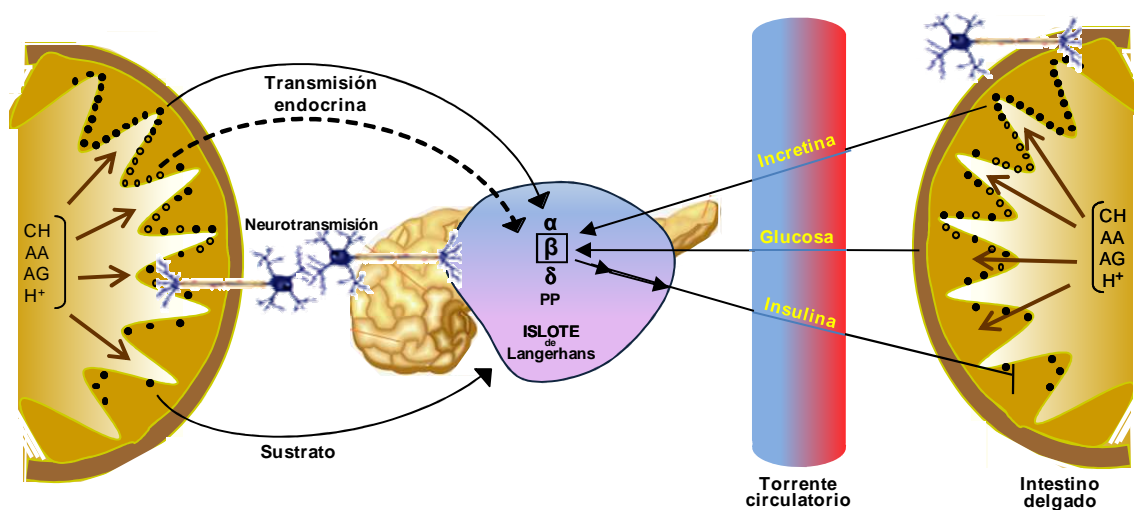


Figura 3. Eje enteroinsular (izda.), y Concepto Incretina (dcha.)

El concepto incretina está muy relacionado con el de *eje enteroinsular* [Unger y Eisentraut, 1969], el cuál comprende todos los estímulos del intestino delgado que inciden, por distintas vías, incluida la nerviosa, en el islote de Langerhans, activando la liberación de sus diversas hormonas (**Fig. 3**). Pero este péptido natural no sólo estimula la secreción de insulina, además de inhibir la de glucagón, sino que también parece incrementar la sensibilidad a la insulina. En individuos sanos, el GLP-1 mejora la tolerancia a la glucosa, tanto a dosis suprafisiológicas [D'Alessio y col., 1994] como fisiológicas [D'Alessio y col., 1995]; y este efecto es, en parte, independiente de la concentración de insulina circulante, lo que en su momento sugirió su acción directa sobre el metabolismo del azúcar. Por otro lado, el efecto incretina del GLP-1 se mantiene en pacientes diabéticos tipo 2, tanto a dosis farmacológicas del péptido [Nauck y col., 1993c] como fisiológicas [Nauck y col., 1993b].

De todos los productos *glucagon-like-peptide*, el GLP-1 es la forma predominante en el intestino de varios mamíferos, incluido el hombre [Mojsov y col., 1986; Ørskov y col., 1986, 1989; Holst y col., 1987; Kreymann y col., 1987, 1988], en los que su secuencia de aminoácidos no sólo es idéntica, sino coincidente con la del glucagón en la posición de catorce de ellos [Seino y col., 1986; Conlon, 1988; Göke y Conlon, 1988], característica a la que se debe su nombre *–glucagon-like–*; además, el GLP-1 es el mayoritario en el plasma, tanto en condiciones basales, [Ørskov y col., 1994] como en el incremento observado tras una comida mixta [Ørskov y Holst, 1987] o sobrecarga oral de glucosa [Kreymann y col., 1987]. Además, el aumento de inmunoreactividad al perfundir intraluminalmente glucosa en el íleon del cerdo [Ørskov y col., 1986] y del perro [Namba y col., 1990], se debe al GLP-1, cuya secreción también aumenta, respectivamente, tras la ingestión o infusión intraduodenal de grasas en el hombre [Takahashi y col., 1991; Elliott y col., 1993; Herrmann y col., 1995] y en el cerdo [Knapper y col., 1995].

Sin embargo, la información relativa a los niveles basales del GLP-1 en plasma, tanto en condiciones normales como en estados que cursan con alteraciones del metabolismo de la glucosa, fue durante mucho tiempo, y por lo general, controvertida; de hecho, mientras que algunos autores describían niveles plasmáticos significativamente más altos en pacientes diabéticos no dependientes de insulina que en sujetos sanos [Hirota y col., 1990; Ørskov y col., 1991; Fukase y col., 1993], otros sostenían lo contrario [Nauck y col., 1993b], todo ello debido, quizás, a la falta de disponibilidad durante

mucho tiempo de un sistema de análisis específico. Hoy en día, los resultados son más consistentes, y parece no haber diferencias detectables entre sujetos normales y diabéticos, tipo 1 o tipo 2 [Lugari y col., 2000]. Por otro lado, varios autores afirman que la respuesta del péptido a estímulos está disminuida en los obesos [Verdich y col., 2001; Valverde y col., 2005] y diabéticos tipo 2 [Toft-Nielsen y col., 2001; Vilsbol y col., 2001], y también en los tipo 1, en los que esa menor liberación de GLP-1 podría estar justificada por una ulterior desensitización de la célula L [Lugari y col., 2000].

En 1987 se documentó por primera vez la capacidad del GLP-1 para estimular la liberación de insulina, tras ser perfundido en el páncreas del cerdo [Holst y col., 1987], y también infundido intravenosamente en el hombre [Kreymann y col., 1987]. Trabajos posteriores ampliaron la confirmación de este efecto –a concentraciones fisiológicas– en el páncreas aislado y perfundido del perro [Kawai y col., 1989] y de la rata [Kawai y col., 1989; Komatsu y col., 1989; Suzuki y col., 1989; Fehmann y Habener, 1992], y en el islote aislado de ratón [Fridolf y col., 1991], así como su acción dependiente de la concentración de glucosa, tanto *in vitro* [Shima y col., 1988; Komatsu y col., 1989; Göke y col., 1993b] como *in vivo* [Faulkner y Pollock, 1991; Nathan y col., 1992; Nauck y col., 1993a; Qualmann y col., 1995]. Además, se supo que el GLP-1: a) estimula la transcripción del gen de la insulina (**Fig. 4**), b) induce su acumulación en los gránulos secretores de células de líneas tumorales pancreáticas [Drucker y col., 1987; Fehmann y Habener, 1992], c) propicia la proliferación de las células  $\beta$  y la neogénesis del islote pancreático [Buteau y col., 2003; Drucker, 2003], d) que su acción insulínica es más potente que la del GIP [Kreymann y col., 1987; Siegel y col., 1992], si bien ambos participan en el efecto incretina [Nauck y col., 1993a], y e) que también actúa directamente en el estómago, donde inhibe la secreción ácida [Schjoldager y col., 1989; O'Halloran y col., 1990; Wettergren y col., 1993] y enlentece su vaciamiento [Wettergren y col., 1993; Willms y col., 1996].

Por otro lado, parece que el GLP-1 tiene acción sobre el sistema nervioso central, puesto que, en el cerebro de la rata (**Fig. 4**), no sólo estimula la secreción de glutamina, ácido glutámico [Mora y col., 1992] y aspártico [Calvo y col., 1995a], sino que puede intervenir en el control de la ingestión de alimentos, generando sensación de saciedad [Navarro y col., 1996; Turton y col., 1996; Blázquez y col., 1998; Flint y col., 1998; Rodríguez de Fonseca y col., 2000]; además, la expresión del gen del receptor del GLP-1 posibilita el efecto del péptido sobre el metabolismo de la glucosa en el cerebro [Álvarez y col., 2005].

La investigación constante sobre las propiedades del GLP-1 ha sacado a la luz otros efectos que no están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa. De hecho, se ha propuesto al GLP-1, y a análogos con capacidad de unión a su receptor cerebral [Goke y col., 1995], y de acción más prolongada, como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico [Larsen y Holst, 2005]. Esta última propiedad del péptido está basada en su demostrada acción neurotrófica en células neuronales en cultivo [Perry y col., 2002] —a las que protege contra la apoptosis inducida por glutamato, y contra el daño oxidativo— y en su capacidad para modificar el proceso del precursor de la proteína  $\beta$  amiloide, y reducir, en neuronas del hipocampo, *in vitro*, y en función de la

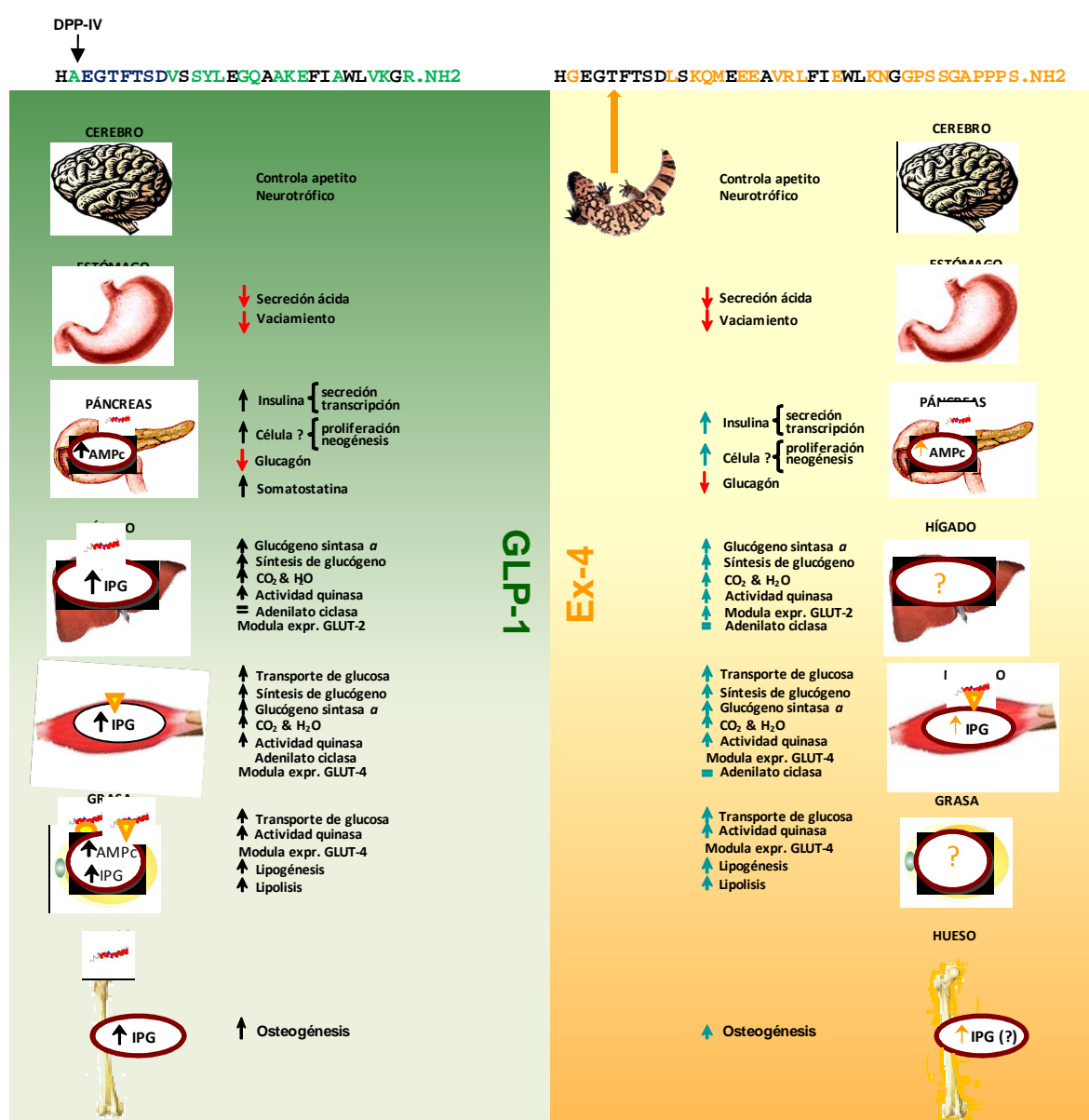


Figura 4. Paralelismos entre la acción de la Ex-4 y el GLP-1

dosis, los niveles de la propia proteína [Perry y col., 2003]. En relación a esto, se ha documentado, en ratones, que el GLP-1 es un potente neuroprotector, y su receptor cerebral ha sido relacionado con el aprendizaje, puesto que aquellos animales con sobreexpresión del mismo en el hipocampo muestran una mayor capacidad de memorización [During y col., 2003]. Últimamente, además, se ha demostrado, en células mesenquimales de médula ósea humana, que el GLP-1 propicia la proliferación celular, es citoprotector, y que inhibe su diferenciación a adipocitos, lo cual indica un potencial terapéutico de esta hormona para combatir la hiperplasia de células adiposas asociada a la obesidad [Sanz y col., 2010].

Las características del efecto antidiabético del GLP-1 [Gutniak y col., 1992] dieron lugar a intuir su acción directa sobre el metabolismo de la glucosa [D'Alessio y col., 1994; 1995]; y los distintos hallazgos impulsaron la búsqueda de receptores específicos, no sólo en el páncreas, sino también en otros tejidos participantes en la homeostasis del azúcar. En relación a ello, se detectó y caracterizó una unión específica del péptido, amidado [Göke y Conlon, 1988; Ørskov y Nielsen, 1988; Valverde y col., 1991] y no amidado [Fehmann y Haberner, 1991], en células pancreáticas de insulinoma de rata de la línea RINm5F, que no sólo no era desplazable por glucagón, GLP-2 o GIP [Philippe y col., 1986; Göke y Conlon, 1988; Ørskov y Nielsen, 1988; Fehmann y Haberner, 1991], sino que también parecía estar asociada a un aumento en la producción de AMPc [Drucker y col., 1987; Göke y Conlon, 1988], sin modificación de los niveles de calcio [Göke y col., 1989]. El receptor para GLP-1 en esa línea de células  $\beta$  está constituido por una proteína monomérica de 63 kDa de peso molecular [Göke y col., 1989] que, por técnicas de estudios de unión, también se identificó en células pancreáticas normales de rata [Valverde y col., 1991]. Mediante hibridación y clonaje, se dedujo su estructura [Thorens, 1992], que resultó tener 463 aminoácidos, y de la que se supo pertenece a la familia de receptores con siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G, que incluye los de secretina, VIP (péptido intestinal vasoactivo), calcitonina, GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento), PTH (hormona paratiroidea) y glucagón [Jelinek y col., 1993], entre otros.

En tejidos extrapancreáticos participantes en el metabolismo de la glucosa, como el adiposo de la rata [Valverde y col., 1993] y del hombre –normal [Mérida y col., 1993] y diabético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994b]–, también se describió la presencia de



receptores específicos para GLP-1 (**Fig. 4**), poco después de que hubiera sido documentado, en adipocitos aislados de rata, su efecto lipolítico y estimulador de la concentración intracelular de AMPc [Ruiz-Grande y col., 1992]. Los receptores para GLP-1 también están presentes en el hígado [Wheeler y col., 1993; Campos y col., 1994; Egan y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995] y en el músculo esquelético de la rata [Wheeler y col., 1993; Egan y col., 1994; Delgado y col., 1995], tejidos en los que parece ser estructural y/o funcionalmente distinto del pancreático [Thorens, 1992], puesto que no propicia la producción de AMPc [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a; Morales y col., 1997; Yang y col., 1998]. También se han detectado receptores para GLP-1 en las glándulas oxínticas del estómago [Uttenthal y Blázquez, 1990], en el pulmón [Lankat-Buttgereit y col., 1994] y, como se ha dicho, en el cerebro [Uttenthal y col., 1992; Calvo y col., 1995b; Álvarez y col., 1996, 2005; Navarro y col., 1996]. Además, muy recientemente se ha documentado la presencia de receptores específicos para GLP-1 en una línea celular de osteoblastos, no asociados al sistema adenilato ciclasa AMPc [Nuche-Berenguer y col., 2010a], y también se ha demostrado que el GLP-1 tiene acción osteogénica en la rata, no sólo en estado normal sino también en el hueso determinado de un modelo experimental de resistencia a insulina y en otro de diabetes tipo 2 [Nuche-Berenguer y col., 2009]

En el tejido adiposo de la rata (**Fig. 4**), sin embargo, el GLP-1 no sólo estimula la lipólisis sino también la lipogénesis [Ruiz-Grande y col., 1992; Perea y col., 1997], la síntesis de glucógeno –a través de la activación de la glucógeno sintasa–, y el transporte, oxidación y utilización de glucosa [Perea y col., 1997; Sancho y col., 2005], efectos, varios de ellos, adicionalmente descritos en el hígado [Valverde y col., 1994; Morales y col., 1997] y en el músculo esquelético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a]. Además, el GLP-1 mimetiza a la insulina en su efecto estimulador sobre la generación de inositolfosfoglicanos (IPGs) –un segundo mensajero en la acción de ésta– en una línea celular de miocitos en cultivo, la BC3H-1 [Galera y col., 1996], en otra de hepatoma humano, la HepG2 [Trapote y col., 1996], y en adipocitos y hepatocitos aislados de rata [Márquez y col., 1998]; también es mimético de la acción de la insulina en el tejido adiposo [Oben y col., 1991; Egan y col., 1994; Miki y col., 1996; Wang y col., 1997a], en el músculo abdominal de ratón [O'Harte y col., 1997], y en distintas líneas de células musculares en cultivo [Yang y col., 1998].

En la actualidad, se dispone de amplia documentación sobre importantes efectos positivos del GLP-1 en relación al metabolismo primordial de tejidos extrapancreáticos, pero hasta ahora no se ha podido definir su receptor en ellos; sin embargo, sí se tiene algún conocimiento sobre su mecanismo de señalización celular.

De hecho, se sabe que el GLP-1 estimula la actividad de la PKB, p42/44 MAPKs, PI3K y p70s6k en hepatocitos y músculo esquelético de rata [Redondo y col., 2003; Acitores y col., 2004], en miotúbulos humanos en cultivo primario [González y col., 2005a], y en el adipocito de la rata y del hombre [Sancho y col., 2005]; también, se ha documentado que activa la p38MAPK, ERKs (extracellular regulated kinases), y la PI3K y PKC  $\zeta$  en células de insulinoma [Buteau y col., 2001] y en las CHO transfectadas con el receptor pancreático del GLP-1 [Montrose-Rafizadeh y col., 1999]. De los enzimas estudiados en los distintos tejidos extrapancreáticos, se sabe que la PI3K/PKB, PKC y PP-1, pero no la PP-2A, son posibles mediadoras en el incremento en el transporte de glucosa y/o actividad glucógeno sintasa a inducido por GLP-1 en el hepatocito [Redondo y col., 2003]; y también las MAPKs, pero no la PP-1, en el músculo esquelético [Acitores y col., 2004] de rata, y la p70s6k en miocitos humanos [González y col., 2005a].

La acción directa del GLP-1 sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos concuerda, además, con resultados de estudios *in vivo*, en los que el tratamiento de la rata con el péptido durante 48 horas mejora la intolerancia a la glucosa que aparece con el envejecimiento [Wang y col., 1997b]. Además, el GLP-1 regula, a nivel traduccional o post-traduccional, la expresión del GLUT-2 y GLUT-4 en hígado, músculo y tejido adiposo (**Fig. 4**) de la rata normal y diabética [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b]; y se ha demostrado que, en el perro, el GLP-1 incrementa la utilización de glucosa en el hígado, que la consecución de su efecto requiere su infusión prolongada, y que éste es aditivo al de la insulina, independientemente de la vía de administración [Dardevet y col., 2004].

La propuesta de utilización del GLP-1 como agente terapéutico en la diabetes tipo 2 [Gutniak y col., 1992] no sólo viene reforzada por lo anterior, sino también por el hecho de que el carácter antidiabético del GLP-1 es evidente tras su inyección subcutánea en estos pacientes [Gutniak y col., 1994], en los que, sea o no amidado, tiene, además, efecto insulínotropico [Elahi y col., 1994]. Pero una vez en el torrente sanguíneo, el GLP-1 es degradado por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), lo que hace que su vida

media sea inferior a dos minutos [Kieffer y col., 1995; Deacon y col., 1995; Holst y Deacon, 1998]; luego, si bien se han puesto grandes expectativas en él como agente terapéutico en la diabetes tipo 2, ese inconveniente obliga a que su administración sea casi continua o muy frecuente. Aunque la eliminación de este obstáculo no ha dejado de ser estudiada por distintos laboratorios –una propuesta inicial había sido su administración como tableta inserta en la mucosa bucal [Gutniak y col., 1997]–, también se están investigando las propiedades de otros posibles agentes antidiabéticos, como es el caso de la exendina 1-39amida, o exendina-4 (Ex-4), que posee muchos de los beneficios fisiológicos y farmacológicos del GLP-1, sin mostrar, en principio, esa desventaja antes mencionada.

La **Ex-4** es la forma natural de la Exenatide® –exendina-4 sintética–, utilizada hoy día en la terapia de la diabetes, sola o en combinación con otros hipoglucemiantes orales [Iltz y col., 2006]. Fue originariamente aislada de la saliva del lagarto *Heloderma Suspectum*, comúnmente llamado *Monstruo de Gila* [Eng y col., 1992]. Su liberación se produce tras morder a su presa –ingestión de alimentos–, y representa el primer ejemplo de una hormona endocrina secretada por una glándula salival [Young, 2002]. Se desconoce si la Ex-4 tiene un papel en la homeostasis calórica de este lagarto, pero sí parece que participa en la regulación de su motilidad intestinal [Christel y col., 2007]. Su secuencia de aminoácidos tiene un 53% de homología con la del GLP-1 (**Fig. 3**), pero procede de la transcripción de un gen distinto y no de un homólogo del gen del proglucagón mamífero [Chen y Drucker, 1997]. En los mamíferos, este péptido es resistente a degradación por DPP-IV y, quizás por ello, tiene una vida media mayor que la del GLP-1. Pero la Ex-4 no es un análogo del GLP-1, es decir, la estructura de la molécula sintética, Exenatide®, no ha sido obtenida por modificación de la secuencia del GLP-1. Sin embargo, la Ex-4 y el GLP-1 comparten muchos de sus efectos glucoreguladores (**Fig.4**), los cuales pueden estar mediados, entre otros, por el receptor pancreático del GLP-1 [Göke y col., 1993a]. Las acciones glucoreguladoras de la Ex-4 incluyen la insulíntrópica dependiente de glucosa [Young y col., 1999; Parkes y col., 2001; Egan y col., 2002; Kolterman y col., 2003], que incluso propicia la reaparición de la primera fase de secreción en diabéticos tipo 2 –inicialmente disminuida en estos pacientes [Fehse y col., 2004]–, la supresión de la de glucagón [Kolterman y col., 2003], la deceleración del vaciamiento gástrico [Kolterman y col., 2003; Young y col., 1999] –que

puede estar paradójicamente acelerada en sujetos diabéticos [Rayner y col., 2001]–, y su efecto reductor sobre la cantidad de alimentos a ingerir [Bhavsar y col., 1998; Szayna y col., 2000]. Además, la Ex-4, como el GLP-1, promueve la proliferación de la célula  $\beta$  y neogénesis del islote pancreático desde células precursoras (**Fig. 4**), tanto *in vitro* como *in vivo* [Xu y col., 1999; Tourrel y col., 2001, Tourrel y col., 2002]. Estas acciones glucoregulatoras de la Ex-4, combinadas con sus ventajas farmacocinéticas, le confieren como resultado un mayor potencial *in vivo* respecto al GLP-1 nativo [Young y col., 1999; Greig y col., 1999].

Si bien las propiedades farmacocinéticas ventajosas de la Ex-4 han impulsado su pronta comercialización y utilización como fármaco en estados de homeostasis de glucosa alterados, no son muchos los trabajos de investigación dirigidos hacia el conocimiento de sus acciones, y características, en los distintos tejidos mayoritariamente participantes en la metabolización del azúcar y lípidos.

No obstante, hasta la fecha se sabe que (**Fig. 4**), en el tejido adiposo, la Ex-4 y su forma truncada, la Ex-9 (exendina 9-39amida), mimetizan al GLP-1 y a la insulina en su acción estimuladora sobre el transporte de glucosa y sobre la lipogénesis en el adipocito de la rata normal [Sancho y col., 2005]; sin embargo, sólo la Ex-4 es también, como el GLP-1, lipolítica, y estos efectos de las exendinas están mediados por distintas quinasas [Sancho y col., 2005]; además, la acción estimuladora de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa en el adipocito, se mantiene en un modelo de diabetes tipo 2, inducida en la rata con estreptozotocina al nacer [Sancho y col., 2005]. En el tejido adiposo del hombre, la Ex-4, como el GLP-1, pero no la Ex-9, estimula la captación de glucosa con la misma eficiencia que la insulina; y en el obeso mórbido [Sancho y col., 2007], como el GLP-1, no modifica el transporte de glucosa basal, y su efecto sobre la lipólisis también es menor que en situación normal; sin embargo, la acción sobre la lipogénesis tanto de la Ex-4 como de la Ex-9, y la de la insulina, está realmente aumentada, incluso por encima, sobre todo en el caso de la insulina, respecto al sujeto normal. Además, la Ex-4, pero no su forma truncada, mimetiza al GLP-1 en sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado y músculo esquelético de la rata, a través de un incremento en la actividad glucógeno sintasa  $\alpha$ , síntesis de glucógeno y oxidación y utilización de la glucosa [Alcántara y col., 1997]. Por otro lado, y sin embargo, en el músculo del hombre, ambas, la Ex-4 y la Ex-9 estimulan el

metabolismo del azúcar [Luque y col., 2002] y, también como el GLP-1, la actividad de diversas quinasas, participantes, algunas de ellas, en esta acción [González y col., 2005a, 2005b].

Resultados muy recientes demuestran que la Ex-4, como el GLP-1, tiene una clara acción osteogénica en la rata (**Fig. 4**), no sólo en estado normal sino también en el hueso deteriorado de un modelo experimental de resistencia a insulina y en otro de diabetes tipo 2 [Nuche-Berenguer y col., 2010b]; en este caso, sin embargo, no parece que la Ex-4 esté utilizando el mismo receptor del GLP-1, cuya presencia y características han sido descritos en una línea de osteoblastos [Nuche-Berenguer y col., 2010a].

Las propiedades glucoreguladoras del GLP-1 y también antidiabéticas de la Ex-4 están ampliamente demostradas; sin embargo, la estrategia terapéutica de ambos ha sido diseñada, de una manera u otra, en base bien sólo a las peculiaridades estructurales de su molécula y/o a la manifestación ulterior de su efecto, con lo que el control de sus condiciones de utilización no está del todo conseguido. Pero lo anterior pasa, necesariamente, por la consecución del total conocimiento, aun por dilucidar, de sus características de acción en tejidos, no sólo los que sin duda participan en la regulación global del metabolismo de la glucosa, sino también otros, aparentemente no implicados, pero que de hecho muestran un patrón alterado en situaciones de homeostasis de la hexosa descompensada.

## PROPÓSITO

La exendina-4 (Ex-4) es un péptido de origen natural no mamífero, parcialmente homólogo al GLP-1 (*glucagon like peptide-1*) –incretina insulino-trópica dependiente de glucosa y antidiabética independiente de insulina—. El GLP-1 y la Ex-4 comparten no sólo su efecto antidiabético sino también varias de sus acciones sobre el metabolismo de la glucosa, lípidos y óseo, en tejidos extrapancreáticos que, en el caso del GLP-1, son ejercidas a través de receptores específicos, distintos, en estructura y/o función, a su receptor pancreático.

En este trabajo se ha pretendido conocer las características de la acción prolongada de la Ex-4, respecto a las del GLP-1, sobre parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa del hígado, músculo y tejido adiposo, en estados de resistencia a insulina y diabetes tipo 2.

**En concreto**, hemos estudiado en la rata normal, y en un modelo experimental de resistencia a insulina y otro de diabetes tipo 2, el efecto del tratamiento continuado con Ex-4 y GLP-1, sobre...

Expresión del glucotransportador GLUT-2 y otros parámetros relacionados con el metabolismo hepático de la glucosa, y también la actividad de distintos enzimas participantes en sus mecanismos de acción celular.

Expresión del glucotransportador GLUT-4 y otros parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa del músculo esquelético, y también la actividad de distintos enzimas participantes en sus mecanismos de acción celular.

Expresión del glucotransportador GLUT-4 y otros parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa del tejido adiposo, y también la actividad de distintos enzimas participantes en sus mecanismos de acción celular.

# MATERIALES y MÉTODOS

## 1. MUESTRAS de ESTUDIO

Para este trabajo se ha utilizado el plasma, el hígado, el músculo esquelético y la grasa epididimaria de la rata Wistar macho normal (N) y de dos modelos experimentales, uno de resistencia a insulina (RI) y otro de diabetes tipo 2 (DT2). Todos los animales procedían del bioterio de la Fundación Jiménez Díaz, y estaban alimentados *ad libitum* con pienso estándar (UAR Panlab, Barcelona, España) y agua.

### 1.1. Modelo experimental de resistencia a insulina (RI)

Se generó por libre exposición de la rata, de 8 semanas de edad, a fructosa en el agua de bebida (20% p/v) durante 65 días [Cancelas y col., 2008]. Tras ello, se determinó el nivel de resistencia adquirido, mediante un *clamp* euglucémico/hiperinsulinémico, que consiste en la estimación de la demanda de glucosa intravenosa para el mantenimiento de una glucemia basal estable, en situación de hiperinsulinemia constante. Con este protocolo de sobrealimentación con fructosa, al menos un 90% de las ratas tratadas desarrollan resistencia a la insulina. Cabe aclarar, no obstante, que la validación del modelo hubo de hacerse previamente en otro grupo de ratas no destinadas a ser incluidas en el estudio, porque la propia aplicación del procedimiento implica la muerte del animal en el último tramo.

### 1.2. Modelo experimental de diabetes tipo 2 (DT2)

Se generó en la rata neonata por inyección de estreptozotocina (STZ), agente de conocida acción citotóxica, altamente específica para la célula  $\beta$  pancreática [Junod y col. 1967, Portha y col. 1979].

#### **Reactivos**

Estreptozotocina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*  
Citrato sódico, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

#### **Procedimiento**

Se preparó una disolución de STZ en citrato sódico 0,05 M, a una concentración de 20 mg/ml y un pH de 4,5, que se inyectó al animal en una única dosis (100 mg/Kg de peso), intraperitonealmente, el día del nacimiento. Transcurridas 8-10 semanas, se

midio en cada rata el coeficiente de utilización de glucosa ( $K$ ), que se estima, tras una sobrecarga intravenosa de la hexosa, según la relación  $[\ln 2 / (T_{1/2} - T_0)] \times 100$ , en la que  $T_0$  es el minuto en el que la glucemia alcanza el valor máximo, y  $T_{1/2}$  es el tiempo en el que ese valor máximo ha descendido, o descendería, a la mitad. Aquellos animales que presentaban un valor de  $K$  inferior a  $2,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , fueron considerados diabéticos, y se utilizaron para el estudio correspondiente no más tarde de una semana después.

## 2. AGENTES en ESTUDIO

En este trabajo se ha utilizado GLP-1 (glucagon-like peptide 1), derivado de la molécula del proglucagón, y exendina-4 (Ex-4), homólogo del anterior en un 53% de su estructura; además, también se ha incluido insulina, de rata y porcina.

GLP-1(7-36) amida, ó proglucagón (78-107) amida [GLP-1], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza*

Exendina 1-39 amida [Ex-4], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza*

Insulina porcina, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca*

Insulina de rata, *Linco, Missouri, EEUU*

## 3. TRATAMIENTO de la RATA con GLP-1 y Ex-4

Con el fin de estudiar el efecto de la acción prolongada de GLP-1 y Ex-4 sobre distintos parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos, se utilizó, como vía de administración, una bomba osmótica implantada subcutáneamente en la rata, según protocolo descrito anteriormente por nuestro laboratorio [Villanueva y col, 1995]. Como control del tratamiento, en ratas de los mismos grupos experimentales, se implantó, en paralelo, una bomba cargada con suero salino.

### **Materiales**

GLP-1 (7-36) amida (GLP-1), *Bachem AG, Bubendorf, Suiza*

Exendina 1-39 amida [Ex-4], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza*

Bomba osmótica mod. ALZET 1003D, *Alza Corp., Palo Alto, EE.UU*

Seda quirúrgica 2/0, *B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España*

Ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) al 10% en  $\text{H}_2\text{O}$

Heparina 1%, *Rovi S.A., Barcelona, España*

Centrifuga BECKMAN CS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU*



### **Procedimiento**

A cada grupo de ratas –normales (N), resistentes a insulina (RI) y diabéticas tipo 2 (DT2)–, se implantó subcutáneamente, en la región interescapular, una bomba osmótica cargada con GLP-1 a la concentración de  $2,06 \times 10^{-4}$  M, o con Ex-4 a la concentración de  $2,40 \times 10^{-5}$  M, ambos disueltos en salino, que se irían liberando a un ritmo de 1  $\mu$ l/h (según la información del fabricante), para el mantenimiento de los niveles circulantes de cada péptido en, aproximadamente,  $10^{-9}$  M. A las 72 horas de implantación de la bomba, se sacrificó al animal. En ese momento, se recogió: 1) el hígado, que se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en los distintos protocolos de estudio; 2) la pareja de músculos sóleos, de los cuales, uno también se mantuvo a  $-70^{\circ}\text{C}$  –medida de expresión de glucotransportadores y de actividad de enzimas de señalización celular (M&M, 5 y 6)–, y el otro se utilizó directamente en el estudio de transporte de glucosa y glucógeno sintasa  $\alpha$  (M&M, 8 y 10). Además, una mitad del total de la grasa epididimaria se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  (M&M, 5 y 6), y la otra se sometió, directamente, al aislamiento de sus adipocitos (M&M, 7).

De todas las ratas, se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 1 ml, antes y después del tratamiento. La sangre se recogió en tubos que contenían 25  $\mu$ l de EDTA, o heparina, y 500 Uic (unidades inhibidoras de calicreína) de Trasylol; el plasma se separó de la fracción celular por centrifugación (15 minutos, 2500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ), y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de la concentración de parámetros relacionados con el metabolismo del azúcar (M&M, 4).

### **4. DETERMINACIÓN de PARÁMETROS en PLASMA**

En las muestras de sangre obtenidas antes y después de cada tratamiento, se determinó la concentración de glucosa e insulina.

#### **Reactivos**

$^{125}\text{I}$ -insulina, obtenida por el método de la cloramina-T

Disoluciones patrón de insulina de rata, *Linco, Missouri, EEUU*

Suero de cobaya anti-insulina GP-25, producido en nuestro laboratorio

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Carbón activado Norit CA 1, *Sigma, St. Louis, MO, EEUU*

Dextrano T70, *Pharmacia, Uppsala, Suecia*

Analizador de glucosa 2, *Beckman, Galway, Irlanda*

La glucosa se valoró por el método de la glucosa oxidasa. La insulina se midió por radioinmunoanálisis, utilizando  $^{125}\text{I}$ -Insulina como trazador radiactivo y un suero anti-insulina porcina producido en cobaya (ambos desarrollados en nuestro laboratorio), e insulina de rata como estándar de referencia; la separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre se realizó por tratamiento con una mezcla de carbón-dextrano [Herbert y col, 1965], todo ello según procedimiento general de análisis previamente descrito por nuestro laboratorio [Valverde y col. 1988].

## 5. ESTUDIO de actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR

En crudo de membranas de los tejidos en estudio, se determinó la actividad de la PI3K –formación de  $\text{PIP}_3$ – y el grado de fosforilación de las MAPKs, por ser éstas enzimas punta de lanza en mecanismos de acción hormonal..

### Material

Yunque y martillo, y vástago de teflón  
 Politrón, Ultra-turrax T8, Ika-Werke, Alemania.  
 Centrífuga Beckman GS-15R, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.  
 Centrífuga Beckman GS-6R, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.

### Reactivos

Fluoruro de fenil sulfonil metano (PMSF), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 Sacarosa, E. Merck, Darmstadt, Alemania.  
 Tris/HCl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 $\text{MgCl}_2$ , Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 EGTA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , E. Merck, Darmstadt, Alemania.  
 NaF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 Leupeptina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 Pepstatina A, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.  
 2-propanol, E. Merck, Darmstadt, Alemania.  
 Triton X-100, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.

### Medios

PMSF: PMSF 20 mM en 2-propanol.

Solubilización (MS): sacarosa 250 mM, tris/HCL 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50mM, EGTA 1,2 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  5 mM, NaF 50 mM, leupeptina 2  $\mu\text{M}$ , Pepstatina 2  $\mu\text{M}$  y PMSF 20 mM, pH 7,4, con 1 % tritón X-100.

### Procedimiento

De los tres tejidos de estudio de cada animal –hígado, músculo y grasa epididimaria–, conservados a  $-70^\circ\text{C}$ , se tomó 500 mg en el caso del hígado, un músculo sóleo de

cada pareja y uno de los dos paquetes de grasa. Todas las muestras se sometieron a homogeneización en MS, bien con vástago de teflón, o politrón [Weinstein, 1994; Arnold, 1993]. Los triturados de hígado y músculo se centrifugaron, respectivamente, a 15.000 y 9.000 g, y a 4°C, para recuperar tras ello el sobrenadante –crudo de membranas plasmáticas–. En el caso del tejido adiposo, éste se sometió inicialmente a 1.810 g, y el infranadante se centrifugó a 13.000 g, descartándose el sedimento. De todos los preparados de crudo de membranas, se retiró un pequeño volumen (10µl) para la determinación del contenido en proteínas totales [Bradford, 1976]; el resto se conservó a -70°C hasta el estudio de su actividad en enzimas de señalización celular –PI3K, como formación de PIP<sub>3</sub>, y MAPKs, como la forma fosforilada respecto a la total–.

### 5.1. PI3K

Se estimó como la fosforilación de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> en inmunoprecipitados de p85 obtenidos por tratamiento de cada muestra con anti-PI3-quinasa p85 y posterior acoplamiento a Proteína-A-agarosa, y en presencia de ATP y fosfatidilinositol/fosfatidilserina como sustrato. El procedimiento, aparte de la inicial inmunoprecipitación de la fracción p85 de la muestra, incluyó la reacción de ésta con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP en presencia del sustrato, la extracción de los lípidos formados, la separación de éstos por cromatografía, y la identificación y cuantificación del PIP<sub>3</sub> formado.

#### i) Inmunoprecipitación

Se realizó en cada crudo de membranas del tejido correspondiente (M&M, 5), por reacción de un anticuerpo contra la subunidad reguladora del enzima PI3K –la p85–, y aislamiento posterior del complejo formado, por acoplamiento a Proteína-A-agarosa.

**Material:** Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Triton X-100, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Ácido etilén-diaminotetraacético (EDTA), *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

LiCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Anti-PI3-Kinase p85 (antisuero de conejo), *Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE.UU.*

Proteína A-agarosa, *Boehringer Mannheim, Barcelona, España.*

**Medios**

Solubilización (MS): descrito en el apartado 5 de este capítulo.

PBS (phosphate-buffered saline): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3 mM, pH 7,4.

Disolución I: Triton X-100 1%, PBS 1x.

Disolución II: Tris-base 0,1 M, EDTA 1 mM, LiCl 0,5 mM.

Disolución III: Tris-base 5 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM.

**Procedimiento**

Se siguió el orden de pasos que se detallan a continuación:

100-500 µg de proteína del crudo de membranas (M&M, 5), ajustada su concentración a 100 µg/ml con medio de solubilización, en tubo Eppendorf.

Adición de 10 µl de suero anti-p85, diluido 1:10, por cada ml de disolución de proteína, e incubación a 4°C durante 16 horas.

Adición de 50 µl de Proteína-A-agarosa por ml, e incubación a 4°C durante 2 horas.

Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos, y eliminación del sobrenadante.

Lavado de los inmunoprecipitados, en el siguiente orden y manera:

- 1 ml de disolución I. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos, y desechado del sobrenadante.
- 1 ml de disolución II. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos, y desechado del sobrenadante.
- 1 ml de disolución III. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos, y desechado del sobrenadante.

Determinación de la actividad PI3K (formación de PIP<sub>3</sub>).

**ii) Formación de PIP<sub>3</sub>**

Se induce en el inmunoprecipitado p85 de cada muestra (M&M, 5), a partir del sustrato fosfatidilinositol/fosfatidilserina añadido, y en presencia de ATP.

**Reactivos**

HEPES, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Fosfatidilinositol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Fosfatidilserina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

EGTA, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

ATP, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

[γ<sup>32</sup>P] ATP (10µCi/µl), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

**Medios**

Solvente del sustrato (SS): HEPES 25 mM con EDTA 1 mM, en agua.

Sustrato (preparación): 1 mg de fosfatidilinositol/1 ml SS y 1,2 mg fosfatidilserina/1,2 ml SS. Combinar ambas disoluciones a partes iguales (v/v), y sonicar la mezcla hasta que la disolución pase de turbia a translúcida. Proteger de la luz y conservar a 4°C.

Mezcla de reacción: HEPES 12,5 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mM, EGTA 0,5 mM, ATP 40  $\mu\text{M}$ , [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (5  $\mu\text{Ci/nmol}$ ).

### **Procedimiento**

A cada inmunoprecipitado (M&M, 5.1.), se añade 25  $\mu\text{l}$  de sustrato; y tras incorporar un mismo volumen de mezcla de reacción, el conjunto se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación periódica. A continuación, se procede a la extracción de los lípidos formados.

### **iii) Extracción y separación de lípidos**

El fin último es el de la recuperación del  $\text{PIP}_3$ , que se consigue por tratamiento de la muestra con un medio orgánico.

#### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Sistema evaporador-concentrador Speed Vac Concentrator, *Savant Instrument Inc., Hicksville, NY, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Metanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

HCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

#### **Medios**

Cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v).

100 mM HCl en metanol.

100 mM en metanol/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v).

### **Procedimiento**

Adición, por el siguiente orden, de:

400  $\mu\text{l}$  de cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v)

150  $\mu\text{l}$  de cloroformo

150  $\mu\text{l}$  de HCl 10mM

Agitación en el vórtex, y centrifugación a 15.000 g y 4°C, durante 30 segundos.

Recogida de la fase inferior y transferencia a nuevo tubo Eppendorf.

Adición de 500  $\mu\text{l}$  de metanol-100 mM HCl/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v).

Mezcla y centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 30 segundos.

Recogida de la fase inferior –extracto de lípidos–, distribución en dos porciones de igual volumen en sendos tubos Eppendorf, y evaporación a sequedad, en un Speed-Vac (20 minutos, aproximadamente).

El extracto obtenido se somete a cromatografía en capa fina en placa de silicagel (TLC), con el fin de aislar, del total de lípidos extraídos, el PIP<sub>3</sub> producido en cada muestra. Para ello, se necesitan los siguientes materiales y reactivos.

### **Material**

Placa de TLC (20 x 20 cm<sup>2</sup>), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Película fotográfica, Hyperfilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Estándar fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP<sub>4</sub>), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Cubeta de cromatografía (24 x 24 x 8 cm<sup>3</sup>), *Teknokroma S. Coop. C. Ltda., Barcelona, España.*

Escáner hp scanjet 7400, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para densitometría. Software Image Quant<sup>®</sup> 3,3, *Molecular Dynamics, EE.UU.*

### **Reactivos**

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

1-Propanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Ácido acético, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Revelador y fijador fotográfico Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

### **Medios**

Revelado: Lx24, al 20% en agua.

Fijación: AL4, al 20% en agua.

TLC: 1-propanol 66%, ácido acético glacial 2%, agua bidestilada 32% v/v.

Se prepara el sistema para cromatografía, mediante la colocación, en la cubeta, de una tira de papel de filtro que forra el fondo y dos de las paredes, y su humidificación con 100 ml de medio TLC. A continuación, y a 3 cm del borde de la placa de silicagel, se aplica el extracto de lípidos correspondiente (30 µl), disuelto en cloroformo, y el estándar PIP<sub>4</sub> de referencia de posición, con una separación de 1,5-2,0 cm entre ellos. La placa se introduce con el extremo de las muestras hacia la base de la cubeta, y así se mantiene mientras que el frente avanza hasta, aproximadamente, 3 cm del extremo superior –4 horas–. Finalizado esto, la placa se deja secar al aire, y se autorradiografía a -70°C (Hyperfilm ECL, Amersham) durante el tiempo que se estime necesario (horas o días). Tras el revelado de la película, se cuantifica la densidad de las bandas mediante densitometría de transmisión, que se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica.

## 5.2. MAPKs

La actividad de las enzimas de señalización intracelular p42/p44 MAPKs, se estimó, en los crudos de membranas de hígado, músculo y tejido adiposo, obtenidos previamente (M&M, 5), mediante la determinación de la proporción de la forma activa del enzima –fosforilada– sobre la total, por la técnica de Western blot.

### i) Western blot

Para el estudio, se utilizaron, de cada tejido, cantidades iguales del preparado de crudo de membranas, que se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida [Laemli, 1970], en paralelo con marcadores de peso molecular, y en un 8% de gel de resolución. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un sistema semiseco (Transblot SD). Para la inmunodetección, se dispuso de un conjunto de reactivos para Western, y se siguieron las instrucciones del fabricante, utilizando anticuerpos respectivos contra la forma total y fosforilada de cada proteína quinasa de estudio y, después, un segundo anticuerpo, antioglobulina en conejo. La detección se realizó por un método quimioluminiscente, y se cuantificaron las bandas por escaneado densitométrico de la autoradiografía [Redondo, 2003]. La medida de densidad correspondiente a cada proteína quinasa fosforilada, se normalizó con respecto a la de la total, y el valor obtenido en la muestra de tejido de cada rata tratada con suero salino se utilizó como control [Sancho, 2007].

## 6. EXPRESIÓN de GLUCOTRANSPORTADORES

Se analizó el ARNm y la concentración de proteína de GLUT-2 en el hígado, y de GLUT-4 en el músculo esquelético y tejido adiposo. El análisis de ARNm se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RCP-TR), y el de la proteína, por Western blot.

### 6.1. ARNm

El protocolo fue común para las muestras de hígado, músculo y tejido adiposo (M&M, 3), e incluyó, por este orden, el aislamiento del ARN total y su cuantificación, la síntesis de ADN complementario (ADNc), y la determinación, con sondas específicas marcadas con un fluorocromo, de la cantidad relativa de ARNm de GLUT-2 y GLUT-4.

## i) Aislamiento de ARN

Se extrajo con TRI REAGENT™, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

### **Material**

Nanodrop ND-1000, Nucliber, Madrid, España.

Centrífuga BECKMAN GS-15R, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.

Centrífuga BECKMAN J-6B, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.

### **Reactivos**

TRI REAGENT™, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.

Cloroformo, Scharlau S.A., Barcelona, España.

Isopropanol, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.

Etanol, E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Dietil pirocarbonato (DEPC), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.

### **Medios**

Etanol al 75% en agua destilada.

Agua-DEPC, DEPC 0,1% en agua destilada. El DEPC se deja agitando durante toda la noche a temperatura ambiente.

## **Procedimiento**

Todos los pasos se realizaron en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar contaminaciones con ARNasas. De los tejidos de estudio (M&M, 3), se homogeneizó, en TRI REAGENT™: 500 µg de hígado en 5 ml, uno de los músculos sóleo en 1 ml, y 1 g de grasa epididimaria en 4 ml. A continuación, se sedimentó el material extracelular a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C, para su desecho. El sobrenadante se distribuyó en fracciones de 1 ml, y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disociación de los complejos núcleo-proteicos. Tras ello, y a cada fracción, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se mezcló con ayuda de vórtex durante 15 segundos, y se dejó reposar a temperatura ambiente entre 2-15 minutos. A continuación, se centrifugó a 12.000 g, 15 minutos, con lo que se produce el fraccionamiento de la mezcla en tres fases, de las cuales, se recogió la acuosa (superior), que contiene el ARN. Ésta se pasó a otro tubo, en el que se añadió 0,5 ml de isopropanol; tras mezclar suavemente, se dejó reposar durante 5-10 minutos, y se sometió a 12.000 g, 10 minutos a 4°C. El sedimento (ARN), tras lavado con etanol al 75% y centrifugación (7.500 g, 5 minutos a 4°C), se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el ARN obtenido se disolvió en agua-DEPC –50 µl en el caso de hígado y grasa, y 30 µl en el del músculo—. Una porción de 1 µl se utilizó para la valoración de la concentración en ARN, que se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El



grado de pureza de la muestra se estimó por la relación de lecturas a  $DO_{260}/DO_{280}$ , considerándose óptimo un resultado comprendido entre 1,7 y 2.

## ii) Síntesis de ADNc

A partir del ARN extraído (4µg), se sintetizó una copia de ADNc por transcripción reversa. Para ello, se utilizó un preparado comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit*), y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

**Material:** Termociclador, *PTC-100*, MJ Research, Waltham, MA, EE.UU.

### **Reactivos**

High-Capacity cDNA Archive Kit: 10X RT Buffer, 25X dNTPs, 10X RP, Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa, *Applied Biosystems 94404*, EE.UU.

**Medio RT:** 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de 10X RP, 1 µl de Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa y 3,2 µl de agua-DEPC

## **Procedimiento**

Se mezcla, suavemente, 4µg de ARN disuelto en 20 µl de agua-DEPC, con 20µl de medio RT, y se somete a tres incubaciones en el termociclador, en el siguiente orden: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, y 2 minutos a 95°C. Al ADNc obtenido se añade 100µl de agua-DEPC (4µg/140µl), y se conserva a -20°C hasta el momento de continuar con el proceso de RCP-TR.

## iii) RCP-TR

Con esta técnica, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Además, la fluorescencia emitida durante la amplificación indica la cantidad de ADN sintetizado en cada momento e, indirectamente, la de ARNm de la muestra.

Las sondas utilizadas, específicas de los glucotransportadores, están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5' y con otro aceptor en el 3', de tal manera que, mientras permanezcan próximos, el fluorocromo en 3' absorbe la emisión del primero. Sin embargo, tras la hibridación de las sondas con la cadena de ADNc, durante la amplificación, la actividad 5' exonucleasa de Taq (polimerasa de *Thermus aquaticus*) hidroliza el extremo 5' de la sonda, y se produce la fluorescencia que es detectada por el lector.

### **Material**

Micro Amp™, placa óptica 96 pocillos, *Applied Biosystems 94404*, EE.UU.

Sequence Detection System, Abi Prism 7000, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

### **Reactivos**

TaqMan Universal PCR Master Mix, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

TaqMan® Gene Expression Assays: Sonda GLUT-2, GLUT-4 y gliceraldehidodeshidrogenasa (GAPDH) de rata, marcados con fluorocromo FAM y 18s eucariota, marcado con fluorocromo VIC, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

### **Procedimiento**

La reacción de amplificación se realizó con 3 µl de ADNc (M&M, 6.1) y en un volumen final de 20 µl, con los cebadores del sistema *Assays on Demand* y los reactivos *TaqMan Universal PCR Master Mix*, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Cada muestra fue analizada por triplicado, y la media de los resultados obtenidos se utilizó para el cálculo de la expresión de ARNm. En el caso del hígado y músculo, la cantidad de ARNm del gen de interés se normalizó con la de ARN ribosómico 18s, y en el caso del tejido adiposo, con la de la GAPDH (por el método de comparación del valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), que fue considerado como el control endógeno.

## **6.2. Proteína**

El procedimiento fue, básicamente, el descrito por nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]. El análisis del contenido en proteína Glut-2 y Glut-4 en membranas celulares aisladas de hígado y músculo esquelético, preparadas según se describe a continuación, y en membranas de tejido adiposo (M&M, 5), se llevó a cabo por la técnica de Western blot, ya descrita en detalle en el apartado 5.2. de este capítulo. Para ello, se utilizó un anticuerpo específico para cada transportador (*E. Merck, Alemania*) y un segundo anticuerpo anti-γ-globulina (ECL anti-rabbit IgG, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra); además, para la normalización de los resultados, se midió, en paralelo, el contenido en tubulina por inmunodetección de los geles con un suero anti-α-tubulina, basándonos en la premisa de que su valor permanece constante en la membrana, en cualquier condición.

### **i) Preparación de membranas**

En el hígado, se aplicó el método de Weinstein y col. [1994], y en el caso del músculo sóleo, se utilizó el método de Arnold y col. [1993].

**Material**

Centrifuga BECKMAN J-6B, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Centrifuga BECKMAN XL-80, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Centrifuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

**Reactivos**

Fluoruro de fenil sulfonil metano (PMSF), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Sacarosa, *E. Merck, Damstadt, Alemania.*

Tris/HCl, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl<sub>2</sub>, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

β-mercaptoetanol, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

EGTA, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *E. Merck, Damstadt, Alemania.*

NaF, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Leupeptina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Pepstatina A, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-propanol, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Triton X-100, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medios**

PMSF 20 mM: (M&M, 5)

Homeogeneización (MH): sacarosa 250 mM, tris/HCL 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, β-mercaptoetanol 50mM, EGTA 1,2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 5 mM, NaF 50 mM, leupeptina 2 μM, Pepstatina 2 μM y PMSF 20 mM, pH 7,4.

Solubilización (MS): (M&M, 5)

**Procedimiento**

El hígado y el músculo se homogeneizaron en MH con vástago de teflón; a continuación, las células intactas, núcleos y mitocondrias de ambos tejidos hígado y músculo, se sedimentaron a 9.000 y 15.000 g durante 10 y 15 minutos, respectivamente. El sobrenadante se decantó y sometió a 100.000 g durante 60 minutos, a 4°C. El nuevo sedimento se resuspendió en MS, y así se mantuvo durante 60 minutos a 4°C; tras ello, en el caso del hígado, se separó la fracción solubilizada (membranas plasmáticas) a 1.000 g durante 5 minutos, y en el caso del músculo, a 15.000g durante 15 minutos. Un pequeño volumen (10μl) fue utilizado para la determinación de proteínas totales [Bradford, 1976], y el resto se conservó a -70°C hasta su utilización en la determinación de la cantidad de proteína del glucotransportador correspondiente (M&M, 5.2.i).

**7. AISLAMIENTO de ADIPOCITOS**

Las células fueron extraídas del tejido epididimario de la rata macho normal –sin alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono–, insulino resistente

(M&M, 1.1.) y diabética tipo 2 (M&M, 1.2.), mediante digestión enzimática con colagenasa P, según el método de Rodbell [1964], con alguna modificación.

### **Reactivos**

Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]-etasulfónico (HEPES), *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.*

Aprotinina (Trasylo<sup>®</sup>) 100.000 UIC/ml, *Bayer, Leverkusen, Alemania.*

Colagenasa P de *Clostridium histolyticum*, *Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.*

D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

HNaCO<sub>3</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

CaCl<sub>2</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España.*

Trypan blue, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

### **Medios**

KRB: NaCl 118 mM, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1,2 mM, HNaCO<sub>3</sub> 25 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM.

Aislamiento: KRB con BSA al 3%, D-glucosa 3,3 mM, HEPES 10,9 mM y Trasylo<sup>®</sup> 500 UIC, pH 7,4.

Incubación: KRB con BSA al 2%, HEPES 10,9 mM y Trasylo<sup>®</sup> 500 UIC, pH 7,4.

Azul de Tripán: NaCl 118 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, HNaCO<sub>3</sub> 25 mM, azul de Tripán 0,2%, pH 7,4.

### **Procedimiento**

El tejido adiposo del epidídimo se introdujo en un vial estéril que contenía medio de aislamiento con colagenasa P (8 mg en 3ml), y se troceó manualmente con ayuda de tijeras; a continuación, la muestra se mantuvo a 37°C con agitación rápida, hasta su completa disgregación. Los adipocitos aislados se separaron por filtración a través de una malla de nylon de 0,6 mm de poro, y se lavaron 3 veces con 10 ml de medio de aislamiento (que se fue descartando), y una vez más con 10 ml de medio de incubación, para la eliminación del exceso de glucosa. La calidad de adipocitos obtenidos se evaluó mediante la prueba de exclusión del Azul de Tripán (25 µl adipocitos + 25 µl Azul de Tripán + 450 µl medio de incubación). Todas las preparaciones utilizadas en este estudio contenían, al menos, un 90% de células viables.

## 8. TRANSPORTE de GLUCOSA

Se midió como incorporación de 2-deoxi-D-[1,2  $^3\text{H}$  (N)] glucosa al interior de la célula, tanto en el músculo esquelético como en los adipocitos aislados, con alguna diferencia entre los protocolos aplicados.

### 8.1. Músculo esquelético

En este caso, se utilizó sorbitol, uniformemente marcado con  $^{14}\text{C}$ , como marcador de acumulación de glucosa extracelular. El procedimiento fue el descrito por Dohm y col. [1988], con algunas modificaciones.

#### Material

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Viales Mini Poly-Q<sup>®</sup>, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### Reactivos

$\text{CaCl}_2$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ , *ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio, EE.UU.*

2-deoxi-D- glucosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-deoxi-D-[1,2  $^3\text{H}$  (N)] glucosa, *Moravek Biochemicals, Brea, California, EE.UU.*

Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]-etasulfónico (HEPES, *Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, EE.UU.*)

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda.*

$\text{MgSO}_4$ , *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Sorbitol [ $^{14}\text{C}$  (U)], *American Radiolabeled Chemicals, Inc., St Louis, MO, EE.UU.*

Sorbitol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

#### Medios

KRB-HEPES (KH): HEPES 20 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, NaCl 120 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, KCl 2,5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$  1 mM, pH 7,45.

NaOH 0,5 N.

Mezcla radioactiva: 30  $\mu\text{l}$  medio KH, con 2-deoxi-D-glucosa 0,5 M, sorbitol 2 M, 2-deoxi-D-[1,2  $^3\text{H}$  (N)] glucosa 0,6  $\mu\text{Ci}$ , sorbitol [ $^{14}\text{C}$  (U)] 0,3  $\mu\text{Ci}$ , para una muestra.

#### Procedimiento

El músculo sóleo aislado (M&M, 3) se mantuvo, inicialmente, y para su estabilización, en 3 ml de medio KH a 37°C durante 15 minutos, con atmósfera de  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  (5/95%); después, las muestras se transfirieron a un nuevo vial con otros 3 ml de medio KH, y se continuó la preincubación durante 30 minutos, tras lo cual, se añadió 30  $\mu\text{l}$  de mezcla

radioactiva (150 nmoles [ $^3\text{H}$ ] 2DOG –actividad específica, 40 nCi/ $\mu\text{mol}$ – y 600 nmoles [ $^{14}\text{C}$ ] sorbitol –actividad específica, 5 nCi/ $\mu\text{mol}$ –), y se mantuvo la incubación durante otros 60 minutos. Al finalizar, se recuperó el músculo del vial, se adsorbió su humedad externa con una gasa, y se lavó dos veces en medio KH a 4°C, a intervalos de 5 minutos, para eliminar el total de radioactividad extratisular. Tras los lavados, la muestra se introdujo en 1 ml de NaOH 0,5 N, y se mantuvo a 70°C hasta la disolución completa del tejido; de ello, se recogió un pequeño volumen (10  $\mu\text{l}$ ) para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford, 1976]; al resto, se añadió 5 ml de líquido de centelleo, para la medida, a doble canal ( $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ ), de su contenido en radioactividad en un contador de radiación beta. Como referencia del total radioactivo de cada isótopo, se preparó, e incluyó en el contaje (CTS), 30  $\mu\text{l}$  de mezcla radioactiva 1:100, que contenía 6 nCi [ $^3\text{H}$ ] 2DOG + 3 nCi [ $^{14}\text{C}$ ] sorbitol.

### Cálculo

Se basó en la premisa de que la cantidad de glucosa extracelular no está en función del estímulo, sino tan sólo de la cantidad –proteína– de tejido.

Al finalizar cada experimento, se dispone de la siguiente información:

**CTSdpm 2DOG**=6 nCi [ $^3\text{H}$ ] 2DOG=150 nmoles 2DOG

**CTSdpm sorbitol**=3 nCi [ $^{14}\text{C}$ ] sorbitol=600 nmoles sorbitol

**Adpm MP (Muestra Problema)**: [ $^{14}\text{C}$ ] dpm, que es el contenido extracelular de sorbitol, y que proporcionará el contenido equivalente de [ $^3\text{H}$ ] 2DOG extracelular.

**Bdpm MP (Muestra Problema)**: [ $^3\text{H}$ ] dpm totales, que es el contenido intra + extra celular de 2DOG.

**Pmg**: media del contenido en proteínas (mg) de todas las muestras del experimento.

Inicialmente, se calcula la cantidad absoluta de 2DOG total (extra + intracelular) y la de sorbitol –que será siempre extracelular–, en cada muestra:

$$A \text{ MPnmol} = \frac{A \text{ MPdpm} \times 600 \text{nmol}}{\text{CTS sorbitoldpm}} \quad B \text{ MPnmol/Pmg} = \frac{B \text{dpm/Pmg} \times 150 \text{nmol}}{\text{CTS 2DOGDpm}}$$

Y teniendo en cuenta que por cada 600 nmoles de sorbitol en la mezcla, hay 150 nmoles de 2DOG:  $B \text{ MPnmol} = 0,25 \times A \text{ MPnmol}$

Como los nmoles de 2DOG intracelular/mg proteína hay que expresarlos finalmente por minuto (60 minutos en este protocolo), la fórmula a aplicar, para cada muestra, fue la siguiente:

$$\text{2DOG intracelular (nmol/mg/min)} = \frac{\frac{\text{Bdpm/Pmg} \times 150 \text{ nmol}}{\text{CTS 2DOGdpm}} - 0,25 \times \frac{\text{Adpm} \times 600 \text{ nmol}}{\text{CTS Sorbitoldpm} \times \text{Pmg}}}{60 \text{ minutos}}$$

## 8.2. Adipocitos aislados

Se evaluó la incorporación de 2-deoxi-D-[1,2 <sup>3</sup>H (N)] glucosa, desde el medio de incubación al citoplasma, siguiendo las pautas descritas por nuestro laboratorio [Perea, 1997], con alguna modificación.

**Material:** Centrífuga BECKMAN MICROFUGE, *Beckman Instruments Inc.*, Palo Alto, CA, EE.UU.

### Reactivos

Aprotinina Trasylol®, *Bayer, Leverkusen, Alemania.*

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, EE.UU.

HNaCO<sub>3</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Citocalasina B, inhibidor del transporte basal, *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, EE.UU.

Bis-(2-etilhexilo)ftalato, para síntesis, *Scharlau, S.A, Barcelona, España.*

El resto de material y reactivos necesarios son comunes con los asignados en M&M, 7 y 8.1.

### Procedimiento

Adipocitos aislados –10<sup>5</sup> células– de ratas en todas las condiciones, contenidos en 100 µl de medio de incubación y en tubo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad (M&M, 7), se incubaron a 37°C, con agitación, y durante 15 minutos, en ausencia (basal) y presencia de insulina; tras ello, se añadió 10µl del mismo medio que contenía 0,2 µCi de 2-deoxi-D-[1,2 <sup>3</sup>H (N)]-glucosa (esta dilución aportó 6,5 pmoles de glucosa) y se continuo la incubación durante otros 3 minutos a 37°C. La reacción se interrumpió por inclusión de las muestras a 4°C, durante 1 minuto. Para la separación de la fase acuosa –radiactividad libre– de la oleaginosa –adipocitos–, se transfirieron dos fracciones de 150 µl de cada muestra a sendos tubos de microfuga con 150 µl de ftalato de bis (2-etil-hexilo), y se sometieron a 12.000 g durante 1 minuto. Cada tubo se cortó por la interfase, y la radiactividad asociada a las células se midió en 3 ml de líquido de centelleo, en un contador de radiación beta. El contenido total de glucosa fue

corregido, por sustracción, con el valor del transporte inespecífico –obtenido en algunas muestras de cada preparación celular tratadas en paralelo con  $1,75 \times 10^{-4}$  M de citocalasina B–, y con el proporcionado por un vial con todos los reactivos pero carente de células –blanco–, que viene a representar el 1-2% del total.

## 9. MEDIDA de CONTENIDO en GLUCÓGENO

Se analizó mediante el método de detección con antrona, según Hassid y Abraham [1957], con algunas modificaciones.

### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*  
Espectrofotómetro SPECTRONIC 1201, *Milton Roy, NY, EE.UU.*

### **Reactivos**

Etanol, *Scharlau, Ferosa, Barcelona, España.*  
KOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
Ácido sulfúrico, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*  
Antrona ( $C_{14}H_{10}O$ ), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
Ácido benzoico, *Merck, Darmstadt, Alemania.*  
Kit de determinación de proteínas, *Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania.*  
Glucógeno, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medio de disolución con antrona:**  $H_2SO_4$  12 M, antrona 7 mM.

### **Procedimiento**

Una porción del hígado de la rata –500 mg– se disgregó en 5 ml de KOH al 30%, y se mantuvo, a 70°C, con agitación, durante 10 minutos; tras su disolución, se recogió una fracción (10  $\mu$ l) para la determinación de proteínas totales [Bradford, 1976]. El glucógeno contenido en el resto se precipitó con etanol al 96%, durante 15 minutos a 4°C, y se separó por centrifugación –2.500 rpm, 10 minutos–. El sobrenadante se descartó, y en el sedimento, disuelto en 1 ml de agua, se midió, frente a una curva patrón, y a 620 nm, la concentración de glucógeno.

## 10. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA *a*

Se estudió en el músculo *sóleo*, en presencia de  $Na_2SO_4$  –activador de la glucógeno sintasa *a* (activa) e inhibidor de la forma *b* [De Wulf y Hers, 1968]– y de NaF –inhibidor de la glucógeno sintasa fosfatasa [De Wulf y Hers, 1968]–. La actividad glucógeno sintasa *a* (GSa) se midió como incorporación de UDP- $[^{14}C]$  D-glucosa en glucógeno, según el método descrito por Hue y col. [1975], con algunas modificaciones.



**Material**

Centrífuga BECKMAN GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*  
 Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

**Reactivos**

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 $\text{CaCl}_2$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 Etanol, *Normasolv, Ferosa, Barcelona, España.*  
 FNa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 Glicilglicina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 Glucógeno, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 KCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 KOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda.*  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*  
 $\text{NaHCO}_3$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*  
 UDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]-D-glucosa, *American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.*  
 UDP-D-glucosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medios**

KRB: (M&M, 7)

Homogeneización (MH): FNa 100 mM, glucógeno al 0,5 %, glicilglicina 50 mM, EDTA 35 mM, pH 7,4.

Incubación (MI): UDP-D-glucosa 0,3 mM, glucógeno 1,2%, glicilglicina 72 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  12 mM, UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]-D-glucosa 0,3  $\mu\text{M}$ , pH 7,4.

**Procedimiento**

Un músculo sóleo de cada rata, se incubó en 3 ml de KRB con 5 mM de glucosa y 1% de BSA, a 37°C durante 60 minutos, seguido de otros 10 minutos a 37°C; tras ello, la muestra se recuperó del vial, se adsorbió su exceso de humedad con una gasa, se eliminó el tendón, y el músculo se conservó en  $\text{N}_2$  líquido hasta el momento de la determinación de su actividad glucógeno sintasa a. Para ello, el tejido se homogeneizó en 500  $\mu\text{l}$  de MH, en un tubo con vástago de teflón, a 4°C; a continuación, la muestra se centrifugó a 228 g durante 15 minutos, y del sobrenadante se recogió un pequeño volumen (10  $\mu\text{l}$ ) para la determinación de su contenido en proteínas totales [Bradford, 1976]; el resto, de no continuar inmediatamente, se conservó a -70 °C.

De cada homogeneizado de músculo, se tomaron 20 µl del sobrenadante anterior, al menos por duplicado, que se añadieron a 100 µl de MI. Tras 15 minutos a 20°C, se añadió 200 µl de KOH 0,5 N, con el fin de interrumpir la reacción y disolver el total de proteínas. El glucógeno formado se extrajo del solubilizado anterior, según describe Fleig y col. [1984], con etanol al 66%; el contenido en radiactividad de cada extracto se midió en 5 ml de líquido de centelleo, en un contador de radiación beta.

## **11. INFORMACIÓN de los RESULTADOS**

Se han expresado como media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM), junto con el número de observaciones (n). La significación estadística ( $p < 0,05$ ) de los incrementos fue valorada por el test de la *t* de Student, o por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del *Least Significant Differences* (LSD) test para comparación múltiple *post-hoc*, mediante el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

## RESULTADOS

### 1. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 en la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIEBÉTICA TIPO 2: *parámetros en plasma*

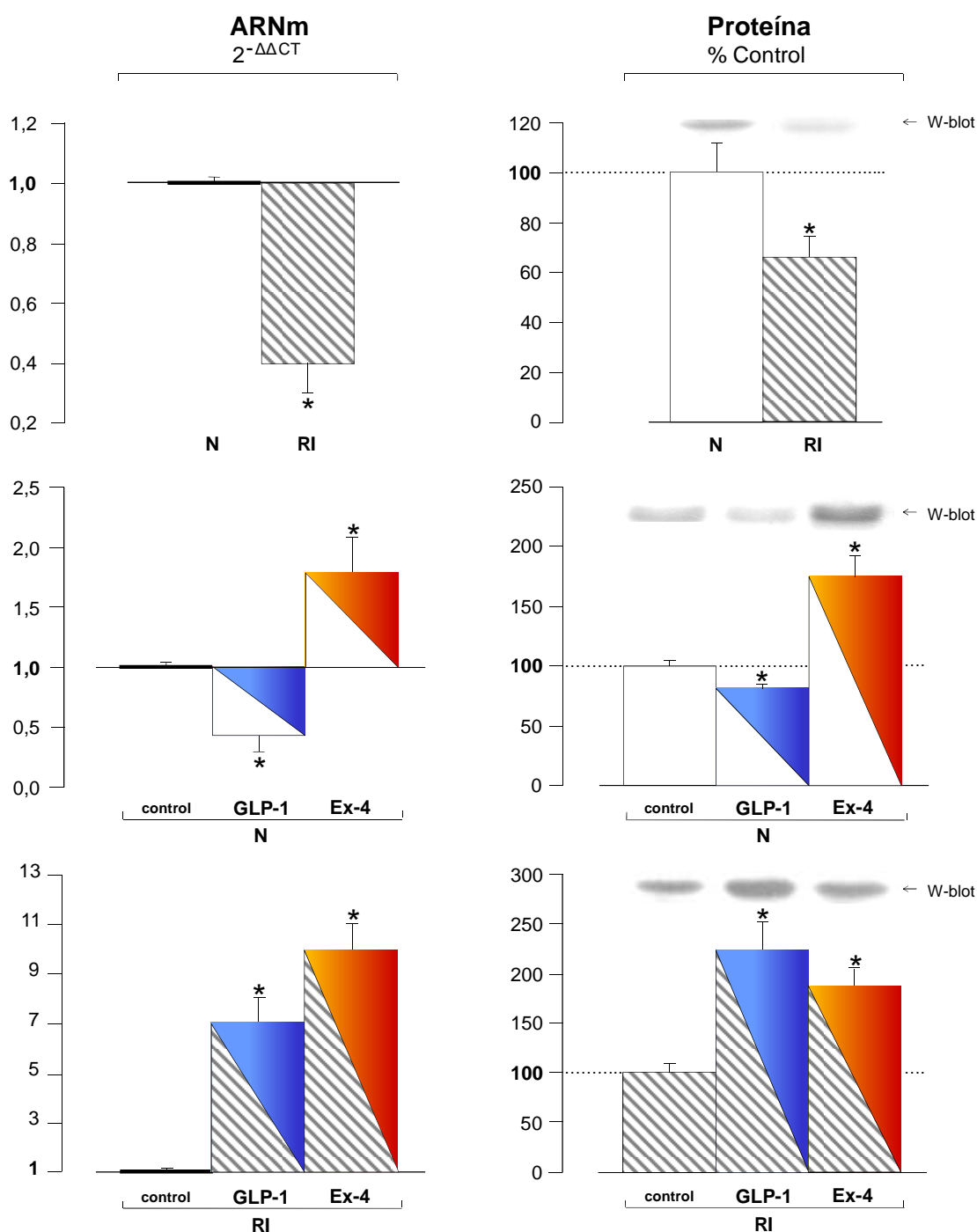
En ninguno de los dos modelos experimentales, resistente a insulina (RI, n=13-34) y diabética tipo 2 (DT2, n=17-33), se detectaron grandes modificaciones en la glucosa o insulina plasmática en cualquier condición, ni respecto al grupo normal (N, n=13-42) ni en relación a la toma previa (basal) o posterior a cada tratamiento, con alguna salvedad.

Específicamente, en la rata RI, la concentración de glucosa basal, respecto a la de la normal ( $102 \pm 5$  ng/dl), fue ligeramente menor ( $91 \pm 3$ ), mientras que la del grupo DT2 resultó ser mayor ( $141 \pm 8$ ,  $p < 0,001$ ); sin embargo, los niveles de insulina circulante en el grupo RI fueron más altos ( $3,0 \pm 0,4$  ng/ml,  $p < 0,02$ ) que en N ( $1,7 \pm 0,2$ ), y los de la rata DT2, más bajos ( $0,7 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$  vs N). Esta aparente falta de cambios generales en la glucosa e insulina plasmática pudo ser muy bien debida al hecho de que la extracción de muestras de sangre se realizó, en todos los grupos, con la rata en estado de saciedad.

### 2. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-2, en el HÍGADO de la rata NORMAL y RESISTENTE a INSULINA

La **figura 5** muestra los niveles de transcripción (ARNm) y traducción (proteína) del gen del GLUT-2, en el hígado de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI, n=4-10) respecto a la normal control (N, n=5-12), y el efecto del tratamiento con GLP-1 (n=4-6) y Ex-4 (n=7). Los resultados están expresados respecto a su propio grupo control o grupo N, bien en porcentaje –proteína– o cantidad relativa –ARNm–.

En relación a la rata normal, el valor del ARNm-GLUT-2 en el hígado del grupo RI fue mucho menor ( $0,4 \pm 0,1$  veces-N,  $p < 0,01$ ), y también fue menor la cantidad de proteína-GLUT-2 ( $66 \pm 8\%$  N,  $p < 0,01$ ). En la rata normal, el tratamiento con GLP-1 indujo una reducción significativa de la expresión génica ( $0,43 \pm 0,13$  veces-N,  $p < 0,05$ ), confirmándose con ello resultados previos de nuestro laboratorio [Villanueva y col., 2001; Arnés et al., 2009], mientras que la Ex-4 incrementó significativamente el valor por encima



**Figura 5.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la expresión de GLUT-2 —ARNm y proteína—, en el hígado de la rata normal (N, □) y resistente a insulina (RI, ▨). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-12 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o RI control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blots representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs control.

del de su propio grupo control ( $1,78 \pm 0,32$  veces-N,  $p < 0,05$ ); también se confirma en este trabajo en relación a la rata normal [Villanueva y col., 2001; Arnés y col., 2009], un ligero pero significativo efecto reductor del GLP-1 ( $81 \pm 3\%$  N,  $p < 0,05$ ), y estimulador de la Ex-4 ( $174 \pm 18\%$  N,  $p < 0,02$ ), sobre la concentración de la proteína GLUT-2. En la rata RI, el tratamiento prolongado tanto con GLP-1 como con Ex-4 indujo un claro aumento del nivel de ARNm, hasta valores (GLP-1:  $7 \pm 1$  veces-RI, y Ex-4:  $10 \pm 1$  veces-RI; ambos  $p < 0,01$ ) incluso por encima de los de la rata normal (GLP-1:  $2,8 \pm 0,4$  veces-N, y Ex-4:  $4,0 \pm 0,4$  veces-N; ambos  $p < 0,001$ ). Respecto a la proteína-GLUT-2, el GLP-1 ( $223 \pm 28\%$  IR,  $p < 0,01$ ), y también la Ex-4 ( $187 \pm 17\%$  RI,  $p < 0,01$ ), produjeron un claro estímulo del valor inicialmente reducido, que alcanzó, en los dos casos, niveles significativamente mayores que los detectados en la rata normal (GLP-1:  $147 \pm 18\%$  N, y Ex-4:  $123 \pm 11\%$  N; ambos  $p < 0,05$ ).

La **tabla 1** refleja las diferencias cualitativas en la expresión del GLUT-2 –ARNm y proteína– en el modelo RI respecto a la rata N, y los cambios en los dos grupos –N y RI– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

### **3. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el CONTENIDO de GLUCÓGENO, en el HÍGADO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

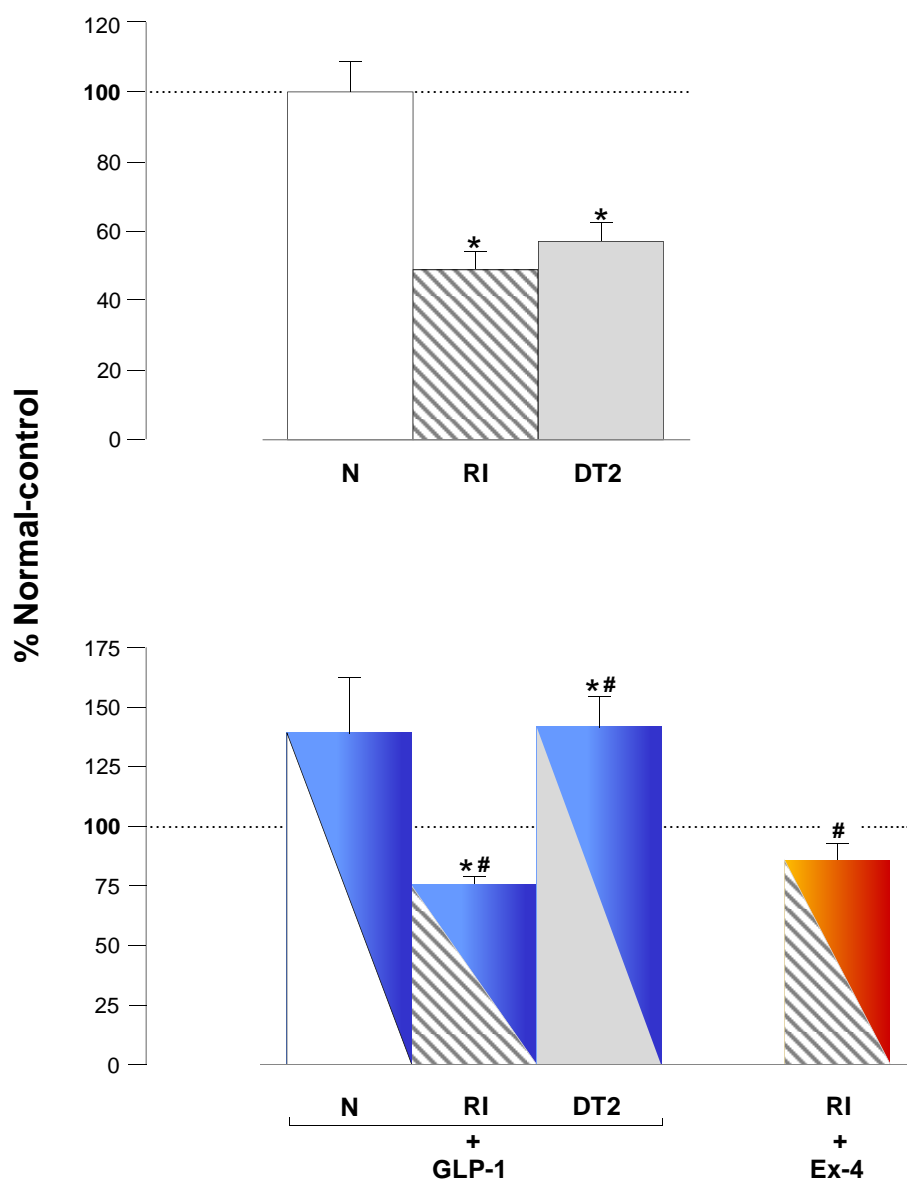
La **figura 6** representa el contenido de glucógeno en el hígado de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=8$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=5$ ), respecto a la normal control (N,  $n=6$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 ( $n=4-11$ ) y Ex-4 ( $n=4-12$ ). Los resultados están expresados en porcentaje del valor en el grupo N control.

El glucógeno hepático en la rata RI ( $193 \pm 20$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) fue menor ( $p < 0,001$ ) que el de la normal ( $395 \pm 34$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína), y también fue menor el de la rata DT2 ( $225 \pm 20$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína), confirmándose con ello resultados previos [Arnés y col., 2009]. Tras tres días de infusión continua con GLP-1, el contenido en glucógeno de la rata normal no sufrió modificación aparente, pero sí se incrementó tanto el de la rata resistente a insulina ( $295 \pm 14$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína,  $p < 0,01$  vs RI), como el del grupo diabético ( $561 \pm 57$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína); este aumento observado en el grupo diabético, fue significativo ( $p < 0,01$ ) respecto a su grupo control DT2; en ambos casos, el incremento

**TABLA 1.** Expresión de GLUT-2 y GLUT-4 (ARNm/proteína) en el modelo de resistencia a insulina (RI) y en el diabético tipo 2 (DT2) en relación a la rata normal (N), y cambios tras tratamiento con GLP-1 o Ex-4, respecto a su propio grupo control tratado con salino.

	N	RI	DT2
	mRNA / proteína	mRNA / proteína	mRNA / proteína
<b><u>Hígado: GLUT-2</u></b>			
Control	— / —	↓ / ↓	↓ / ↑
GLP-1	↓ / ↓	↑ / ↑	↓ / —
Ex-4	↑ / ↑	↑ / ↑	↑ / ↑
<b><u>Músculo: GLUT-4</u></b>			
Control	— / —	↑ / ↑	— / ↓
GLP-1	↑ / ↓	↑ / ↑	↑ / ↑
Ex-4	↖ / ↑	↑ / ↑	— / —
<b><u>Tejido adiposo: GLUT-4</u></b>			
Control	— / —	↓ / —	↖ / ↓
GLP-1	↓ / ↓	— / ↑	↓ / ↑
Ex-4	↖ / —	↑ / —	— / ↑

—, indistinto; ↖ y ↘ ligeramente más alto y más bajo, respectivamente; ↑ y ↓, significativamente más alto y más bajo, respectivamente



**Figura 6.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre el contenido de glucógeno, en el hígado de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-12 ratas, están expresados en porcentaje del valor del grupo N control tratado con salino. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control; #  $p < 0,05$ , o menor, vs control respectivo, RI o DT2.

inducido en los dos modelos, RI y DT2, hizo que el contenido en glucógeno alcanzara valores incluso por encima ( $p<0,05$ ) de los de la rata normal. La Ex-4 también incrementó el contenido hepático de glucógeno en la rata RI ( $338\pm 27$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína,  $p<0,01$  vs RI) en magnitud similar al efecto inducido por GLP-1, y hasta niveles indistinguibles de los del hígado de la rata normal control.

La **tabla 2** refleja las diferencias cualitativas en el contenido de glucógeno hepático en los dos modelos experimentales, RI y DT2, respecto a la rata N, y los cambios en los tres grupos –N, RI y DT2– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

#### **4. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el HÍGADO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

En este trabajo, hemos estudiado la actividad de la PI3K y de las MAPKs, porque son enzimas punta de lanza en los mecanismos de señalización celular, y por estar éstas implicadas en varias de las acciones del GLP-1 y de la Ex-4 sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos.

##### **PI3K**

Las **figuras 7 y 8** ilustran la cantidad de  $\text{PIP}_3$  formado desde  $\text{PIP}_2$ , en el hígado de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=5$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=5$ ) respecto a la normal control (N,  $n=5$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 ( $n=4-8$ ) y Ex-4 ( $n=4-6$ ). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento del valor de su propio grupo control o del de N.

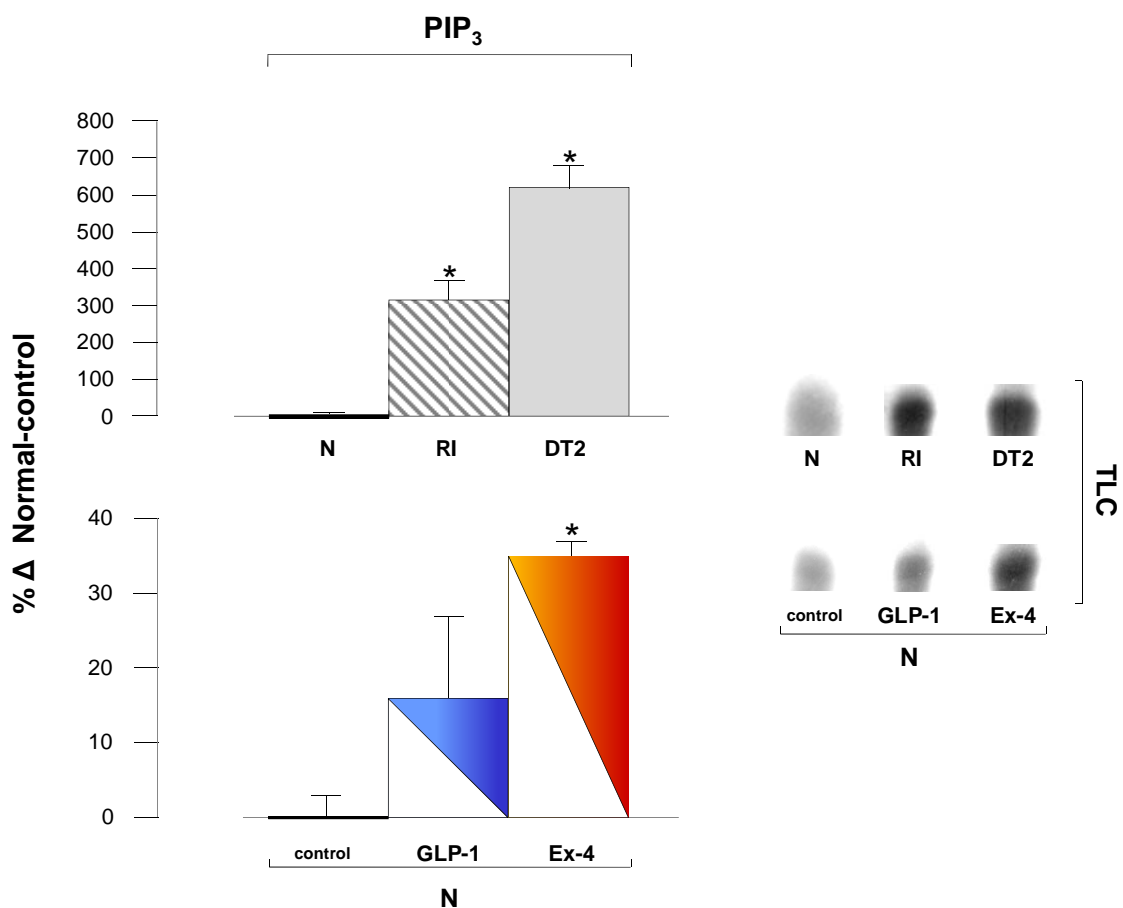
En el hígado del grupo RI, la actividad PI3K fue mucho mayor ( $p<0,01$ ) que en el de la rata normal, y también fue mayor ( $p<0,001$ ) en el de la diabética (**Fig. 7**). Ambos, el GLP-1 y la Ex-4 indujeron un aumento en la formación de  $\text{PIP}_3$ , moderado pero estadística significativo, en la rata normal (media conjunta:  $126\pm 7\%$  N,  $p<0,05$ ). Por otro lado, a pesar de la hiperactividad inicial de la enzima en el grupo RI (**Fig. 8**), la célula de este modelo mantuvo su capacidad de respuesta a ambos péptidos (media conjunta:  $143\pm 9\%$  RI,  $p<0,02$ ), y el mismo fenómeno se detectó en el grupo DT2 (media conjunta:  $210\pm 18\%$  DT2,  $p<0,01$ ).



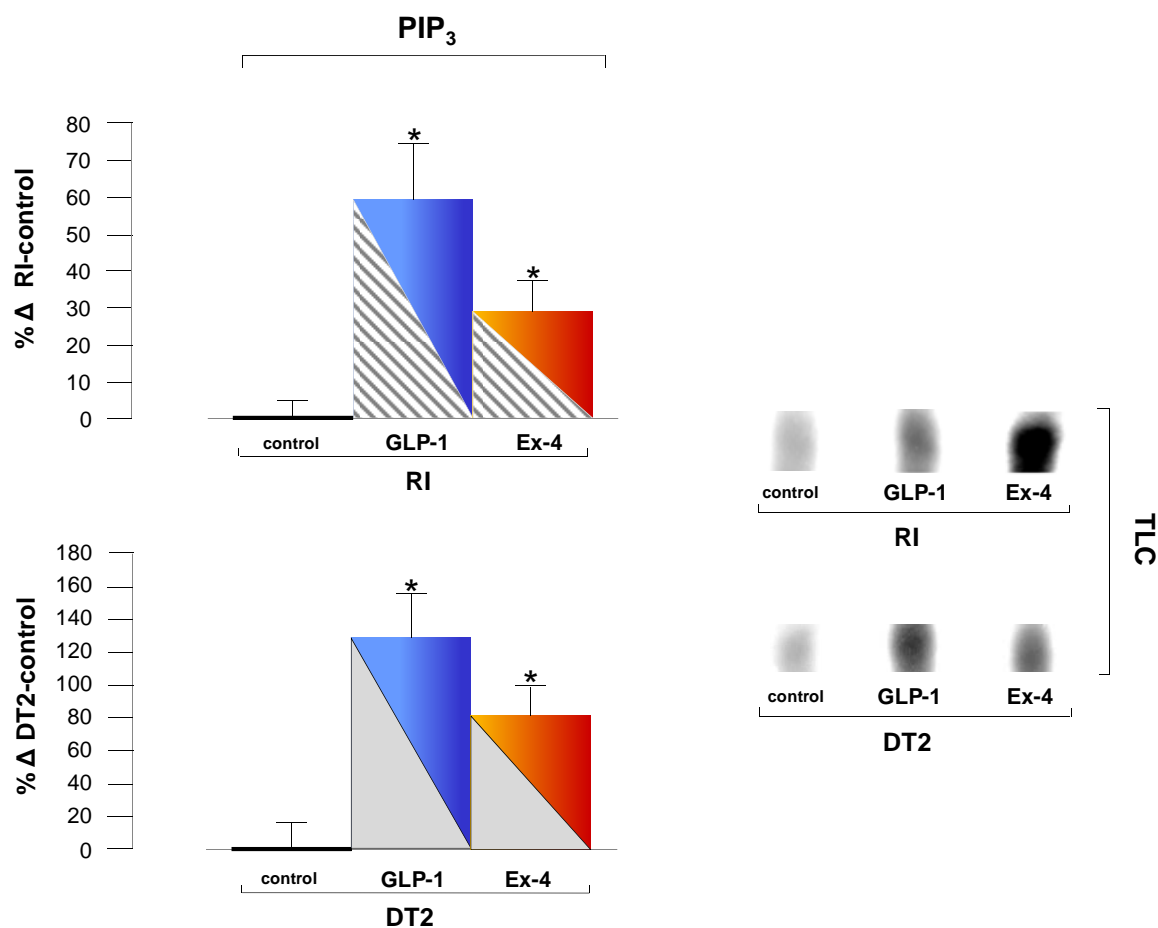
**TABLA 2.** Contenido en glucógeno, transporte de glucosa (TG) y glucógeno sintasa (Gsa), en el modelo de resistencia a insulina (RI) y en el diabético tipo 2 (DT2) en relación a la rata normal (N), y cambios tras tratamiento con GLP-1 o Ex-4 respecto a su propio grupo control tratado con salino.

		N	RI	DT2
<b>HÍGADO Glucógeno</b>	<b>Control</b>	—	↓	↓
	<b>GLP-1</b>	—	↑	↑
	<b>Ex-4</b>	—	↑	↑
<b>MÚSCULO TG</b>	<b>Control</b>	—	↓	—
	<b>GLP-1</b>	—	↑	—
	<b>Ex-4</b>	—	↑	↑
<b>MÚSCULO GSa</b>	<b>Control</b>	—	↓	↓
	<b>GLP-1</b>	↓	↑	—
	<b>Ex-4</b>	↓	↑	↑
<b>T. ADIPOSO TG</b>	<b>Control</b>	—	↓	↑
	<b>GLP-1</b>	↑	↑	↓
	<b>Ex-4</b>	—	↑	↓

—, indistinto; ↑ y ↓, significativamente más alto y más bajo, respectivamente.



**Figura 7.** Actividad PI3K –PIP<sub>3</sub>– en el hígado de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) en la rata N. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-5 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control.



**Figura 8.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad PI3K –PIP<sub>3</sub>–, en el hígado de la rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-8 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2.

## MAPKs

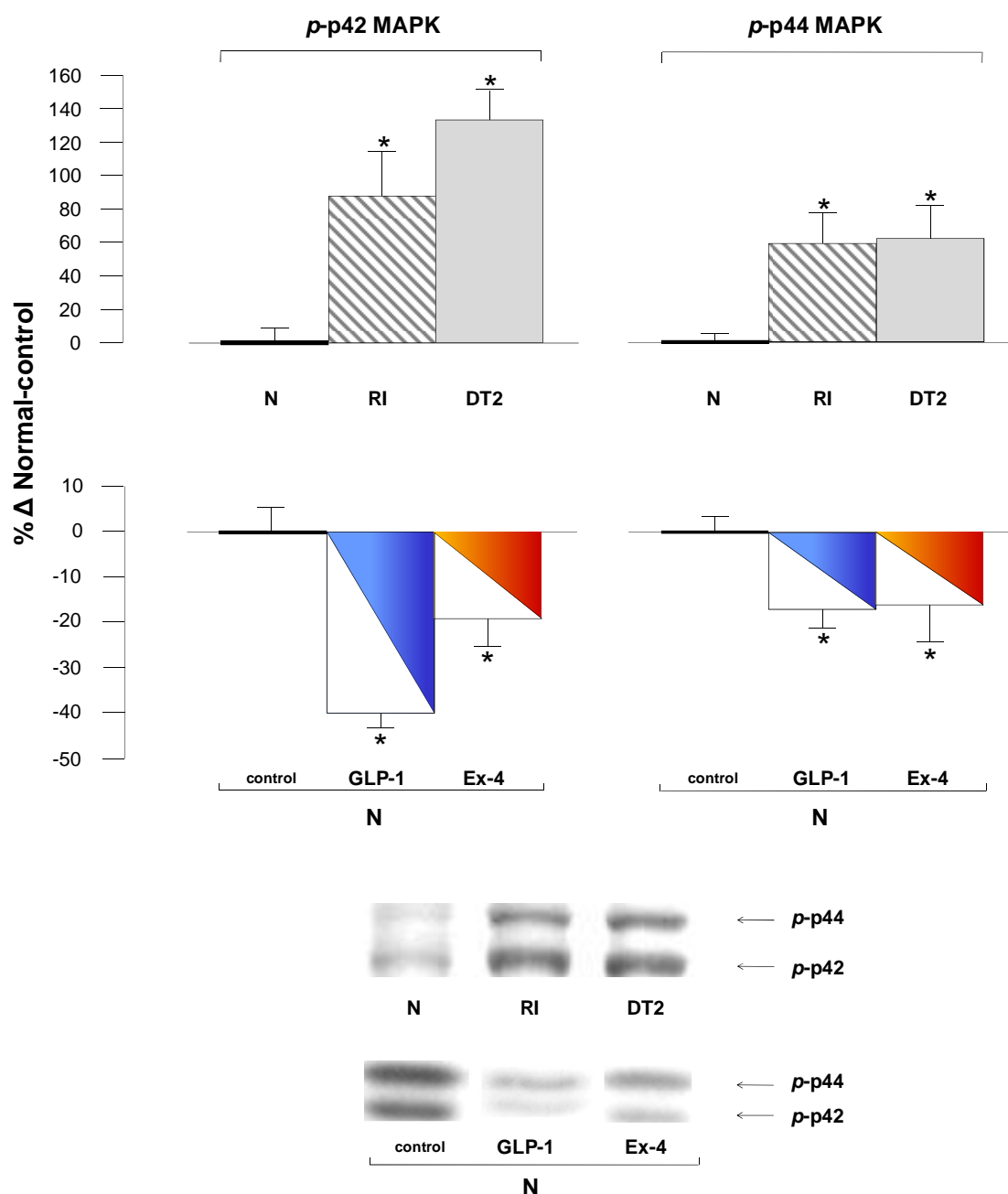
Las **figuras 9 y 10** ilustran el grado de fosforilación (*p*-) de la p42 y p44 MAP quinasas en el hígado de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI, n=10) y diabética tipo 2 (DT2, n=8), respecto a la normal control (N, n=10), y el efecto del tratamiento con GLP-1 (n=5) y Ex-4 (n=5). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de N, o sobre el de su propio grupo control.

En el grupo RI, el valor de *p*-p42, y también el de *p*-p44, fueron significativamente mayores ( $p<0,001$ ) que los correspondientes en el hígado de la rata normal (**Fig. 9**), y la misma hiperactividad de las dos isoformas se observó también en la rata DT2 ( $p<0,02$  vs N). El tratamiento de la rata normal con GLP-1, y también con Ex-4, redujo los valores iniciales tanto de la p42 como de la p44 MAPK. En el grupo RI, el GLP-1 incrementó aun (**Fig. 10**) más la actividad p42 MAPK ( $230\pm53\%$  RI,  $p<0,05$ ), sin modificar la de p44; la Ex-4 tampoco alteró el valor de la p44, pero sí estimuló ( $p<0,01$ ) aun más la sobreactividad inicial de la p42. En la rata DT2, ni el GLP-1 ni la Ex-4 mostraron tener efecto alguno sobre la p42 MAPK; sin embargo, mientras que el GLP-1 aumentó todavía más el grado de fosforilación de p44 ( $104\pm10\%\Delta$  N,  $p<0,001$ ), la Ex-4 no alteró la actividad inicial del enzima.

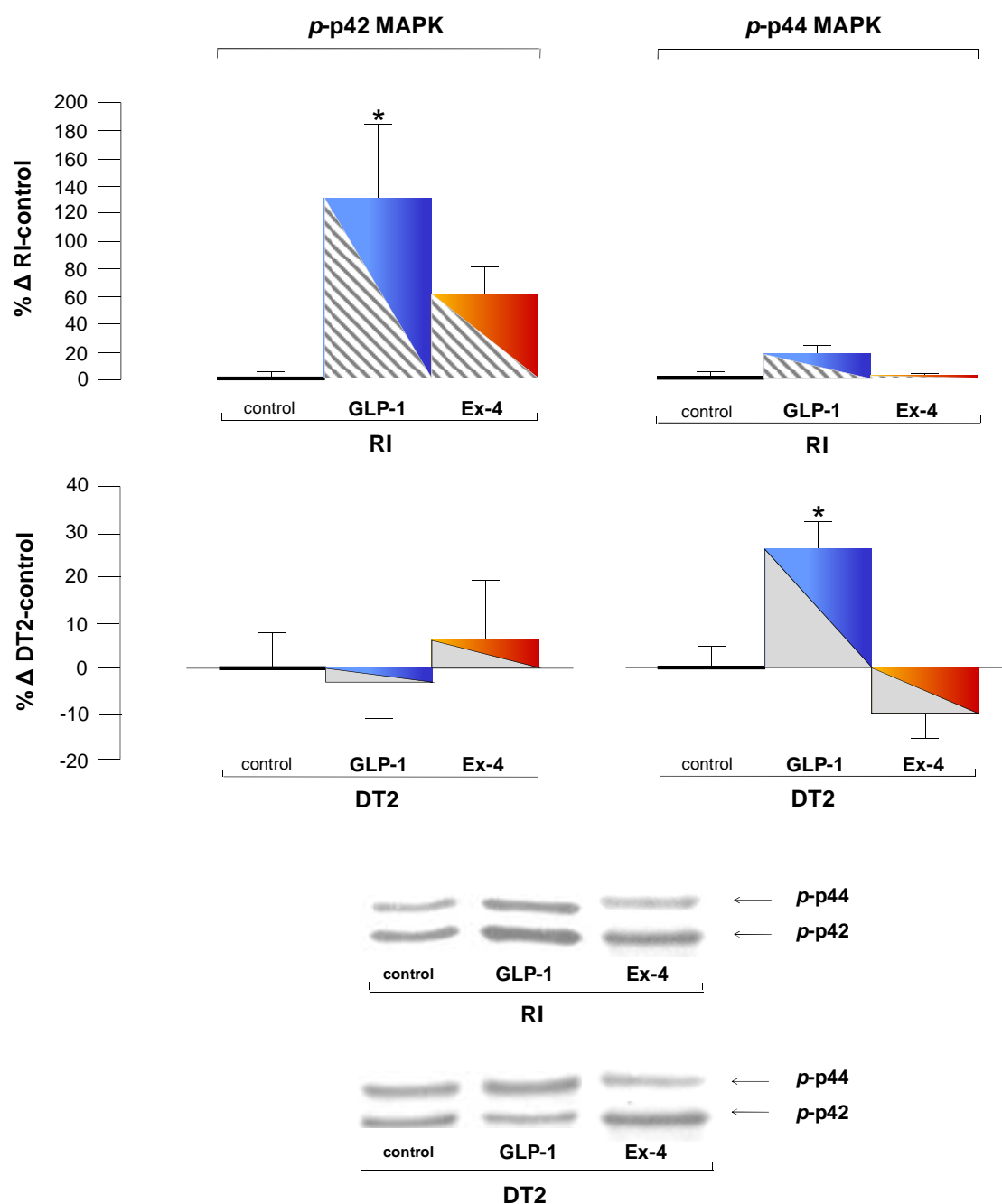
## 5. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el MÚSCULO de la rata NORMAL y RESISTENTE a INSULINA

La **figura 11** muestra los niveles de la transcripción (ARNm) y traducción (proteína) del gen del GLUT-4, en el músculo de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI, n=5-10) respecto a la normal control (N, n=8), y el efecto del tratamiento con GLP-1 (n=5-10) y Ex-4 (n=5-10). Los resultados están expresados en relación al valor de su propio grupo control o al del grupo N, bien en porcentaje –proteína– o cantidad relativa –ARNm–.

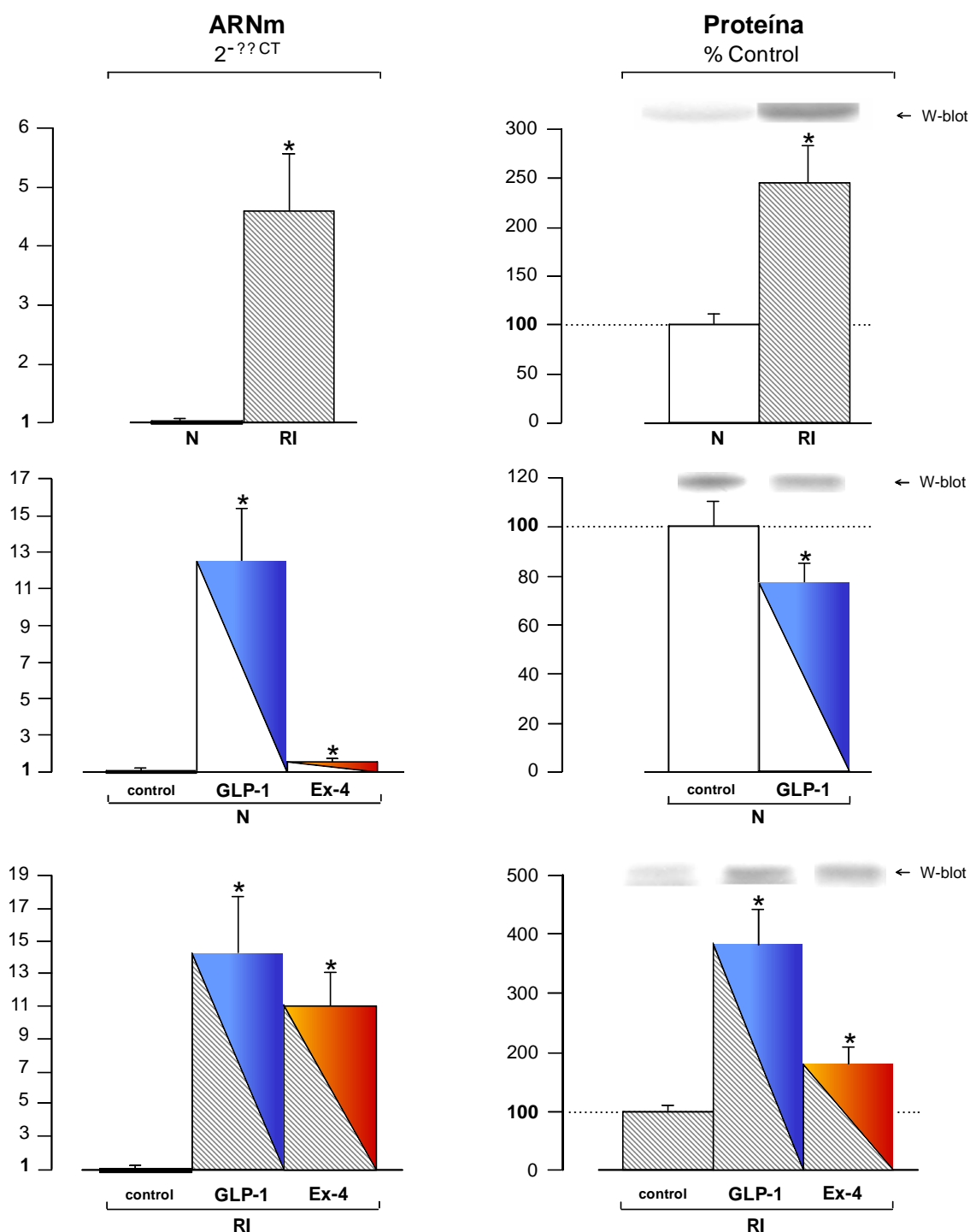
El ARNm del GLUT-4 en el músculo de la rata RI resultó estar sobreexpresado respecto al de la rata normal ( $4,6\pm1,0$  veces-N,  $p<0,01$ ), y también lo estaba la proteína ( $243\pm39\%$  N,  $p<0,05$ ). El tratamiento de la rata normal con GLP-1, y también con Ex-4, indujo un aumento significativo en la expresión génica del glucotransportador (ambos,  $p<0,02$ ), sin modificación aparente del nivel de proteína. En el grupo RI, tanto el GLP-1 como la Ex-4 incrementaron aun más el valor inicialmente sobreexpresado del gen



**Figura 9.** Actividad (p-) p42/p44 MAPK en el hígado de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) en la rata N. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-10 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blot representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control; #  $p < 0,05$ , o menor, vs respectivo, RI o DT2.



**Figura 10.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad (p-) p42/p44 MAPK, en el hígado de rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-10 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blot representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2 control.



**Figura 11.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la expresión de GLUT-4 - ARNm y proteína-, en el músculo esquelético de la rata normal (N, □) y resistente a insulina (RI, ▨). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 5-10 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o RI control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blots representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs control.

(media conjunta:  $12,7 \pm 3$  veces-RI,  $p < 0,001$ ), y este mismo efecto estimulador de ambos péptidos ( $p < 0,02$ ) se observó en relación a la proteína (GLP-1:  $383 \pm 59\%$  RI; Ex-4:  $176 \pm 27$ ).

La **tabla 1 (pág. 43)** refleja las diferencias cualitativas en la expresión del GLUT-4 –ARNm y proteína– en el modelo RI respecto a la rata N, y los cambios en los dos grupos –N y RI– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

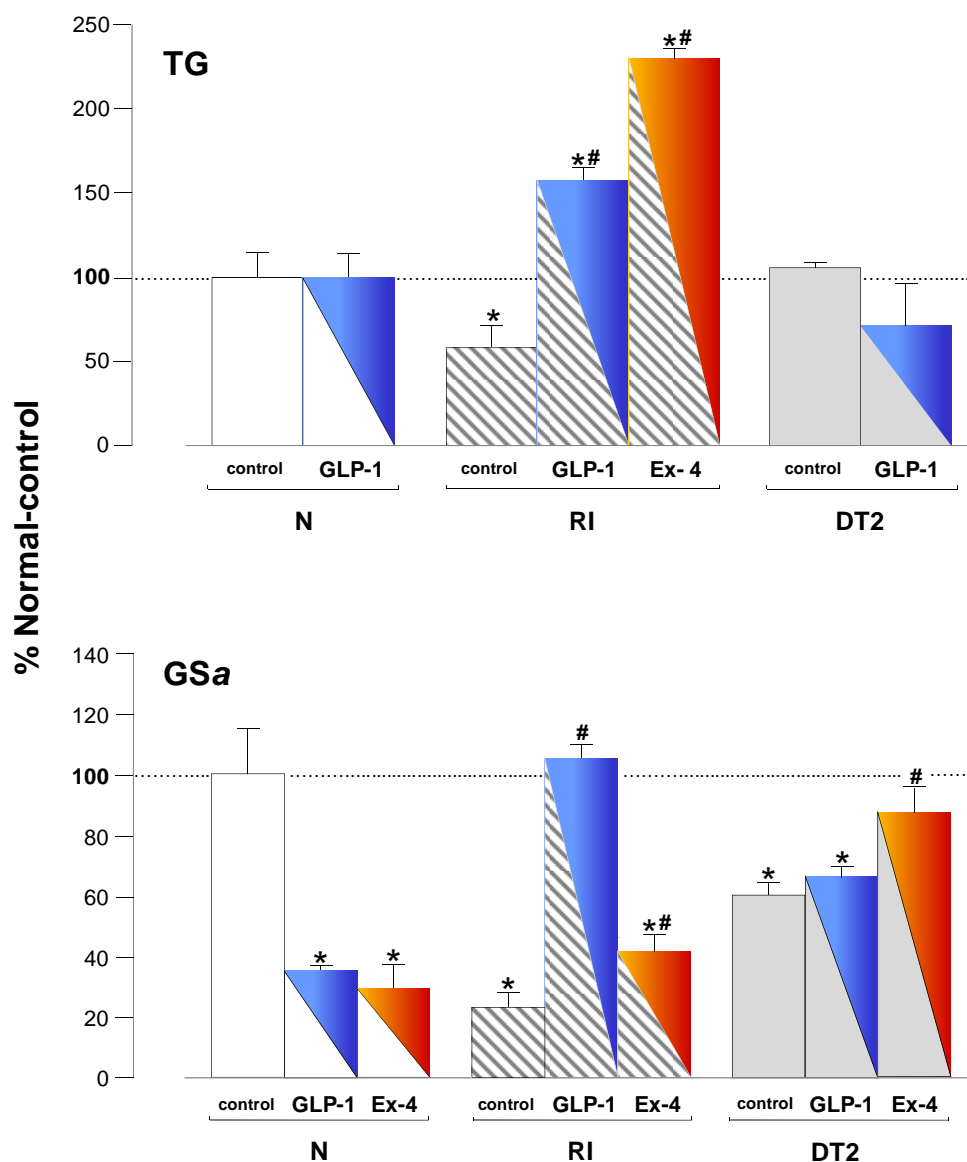
## 6. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA y actividad GLUCÓGENO SINTASA $\alpha$ , en el MÚSCULO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2

En la **figura 12** está representado el transporte de glucosa (TG) y actividad glucógeno sintasa  $\alpha$  (GS $\alpha$ ) en el músculo de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI) y diabética tipo 2 (DT2), respecto a la control normal (N), y el efecto del tratamiento con GLP-1 y Ex-4. Los resultados están expresados en porcentaje del valor del grupo N control.

### **Transporte de glucosa**

En el músculo esquelético de la rata normal, el tratamiento con GLP-1 ( $n=5$ ) no modificó el valor de captación del azúcar (TG) control ( $0,418 \pm 0,090$  nmol/mg proteína/minuto), ni tampoco la Ex-4 ( $n=8$ ) produjo efecto alguno, tal y como ya habíamos observado en este último caso [Arnés y col., 2009]. El músculo del grupo RI mostró valores sensiblemente menores de lo normal ( $0,192 \pm 0,040$ ,  $p < 0,05$  vs N); en este modelo, el tratamiento con GLP-1 ( $n=10$ ), y también con Ex-4 ( $n=10$ ), originó un claro aumento en la captación de la hexosa (GLP-1:  $268 \pm 13\%$  IR, y Ex-4:  $392 \pm 9$ ; ambos  $p < 0,001$ ), que dio como resultado valores incluso por encima ( $p < 0,001$ ) de los de la rata normal ( $n=4$ ). El nivel de TG en el músculo esquelético del grupo DT2 ( $0,348 \pm 0,008$  nmol/mg proteína/minuto,  $n=5$ ) resultó similar al de la rata normal, tal y como ya habíamos descrito previamente [Arnés y col., 2009]; sin embargo, tras tratamiento con GLP-1 ( $n=4$ ) no se detectó modificación aparente respecto a su propio grupo control, a diferencia de la Ex-4, sobre la cual habíamos observado [Arnés y col., 2009] produce un ligero aumento.





**Figura 12.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre el transporte de glucosa (TG) y actividad glucógeno sintasa  $\alpha$  (GSa), en el músculo esquelético de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media $\pm$ EEM), correspondientes a 4-10 ratas, están expresados en porcentaje del valor del grupo N control tratado con salino. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control; #  $p < 0,05$ , o menor, vs control respectivo, RI o DT2.

### **Glucógeno-sintasa *a***

La actividad del enzima (GSa) en la rata normal ( $n=5$ ), medida como incorporación de la UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]-D-glucosa en glucógeno ( $1,80 \pm 0,14$  U/g proteína), resultó en una disminución de la misma (**Fig. 12**) tras tratamiento con GLP-1 ( $0,65 \pm 0,02$ ,  $n=3$ ,  $p < 0,001$  vs N); y esa misma acción reductora se detectó en la Ex-4 ( $0,53 \pm 0,16$ ,  $n=4$ ,  $p < 0,05$  vs N). En la rata RI, el valor de GSa ( $0,41 \pm 0,09$  U/g proteína) fue menor ( $p < 0,01$ ) que el del músculo de la normal; en este caso, sin embargo, el tratamiento con cualquiera de los dos péptidos, GLP-1 ( $n=4$ ) o Ex-4 ( $n=6$ ), indujo una estimulación clara en la actividad del enzima (GLP-1:  $461 \pm 22\%$  IR, y Ex-4:  $181 \pm 24\%$  IR; ambos,  $p < 0,001$ ), que con GLP-1 alcanzó niveles de normalidad. En la rata DT2 ( $n=5$ ), si bien el valor de GSa también fue menor ( $p < 0,001$ ) que el del músculo de la normal, éste, sin embargo, resultó mayor ( $p < 0,05$ ) que el del grupo RI; y mientras que el GLP-1 ( $n=4$ ) no afectó aparentemente la actividad del enzima en este modelo, la Ex-4 ( $n=5$ ) mostró una acción estimuladora ( $1,57 \pm 0,15$  U/g proteína,  $p < 0,05$  vs DT2), con la que se alcanzaron niveles muy próximos a los de la rata normal.

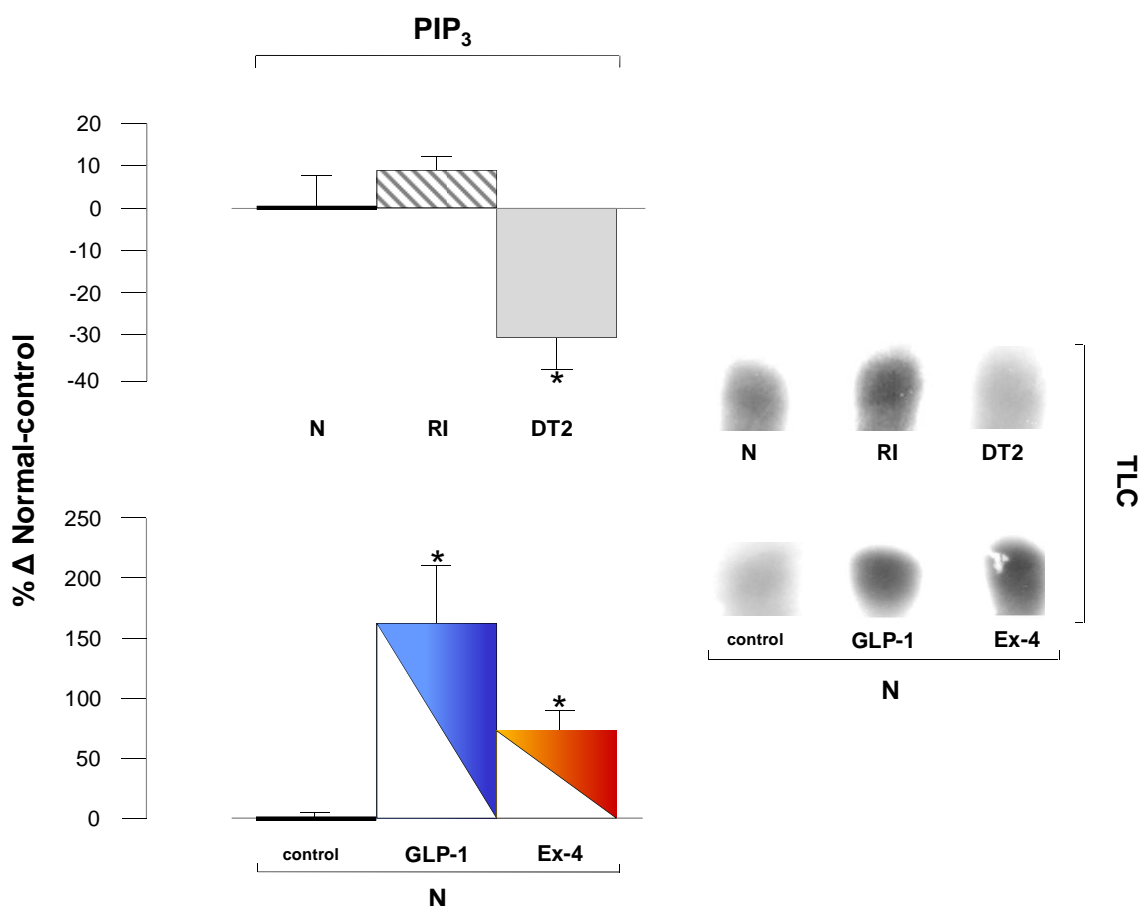
La **tabla 2 (pág. 46)** refleja las diferencias cualitativas en el transporte de glucosa y actividad glucógeno sintasa *a* en los dos modelos experimentales, RI y DT2, respecto a la rata N, y los cambios cualitativos en los tres grupos –N, RI y DT2– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

## **7. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el MÚSCULO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

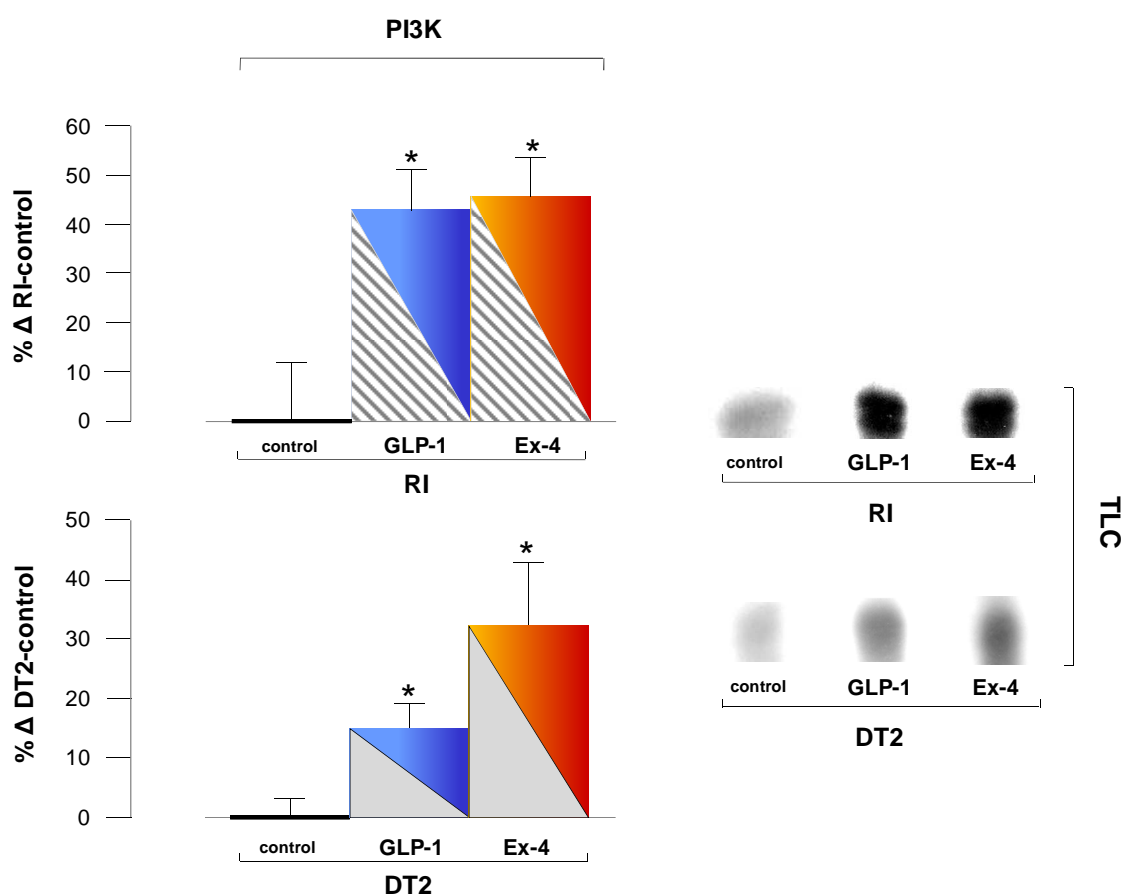
En este trabajo, hemos estudiado la actividad de la PI3K y de las MAPKs, porque son enzimas punta de lanza en los mecanismos de señalización celular, y por estar éstas implicadas en varias de las acciones del GLP-1 y de la Ex-4 sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos.

### **PI3K**

Las **figuras 13 y 14** ilustran la concentración de  $\text{PIP}_3$  formado desde  $\text{PIP}_2$ , en el músculo esquelético de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=6$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=4$ ), respecto a la normal control (N,  $n=5$ ), y el efecto del



**Figura 13.** Actividad PI3K – $\text{PIP}_3$ – en el músculo esquelético de la rata normal (N,  $\square$ ), resistente a insulina (RI,  $\square$  con diagonal) y diabética tipo 2 (DT2,  $\square$  gris), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (  $\square$  azul ) y Ex-4 (  $\square$  rojo ) en la rata N. Los resultados (media $\pm$ EEM), correspondientes a 4-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0.05$ , o menor, vs N control.



**Figura 14.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad PI3K  $\rightarrow$  PIP<sub>3</sub>, en el músculo esquelético de la rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▨). Los resultados (media $\pm$ EEM), correspondientes a 4-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2.

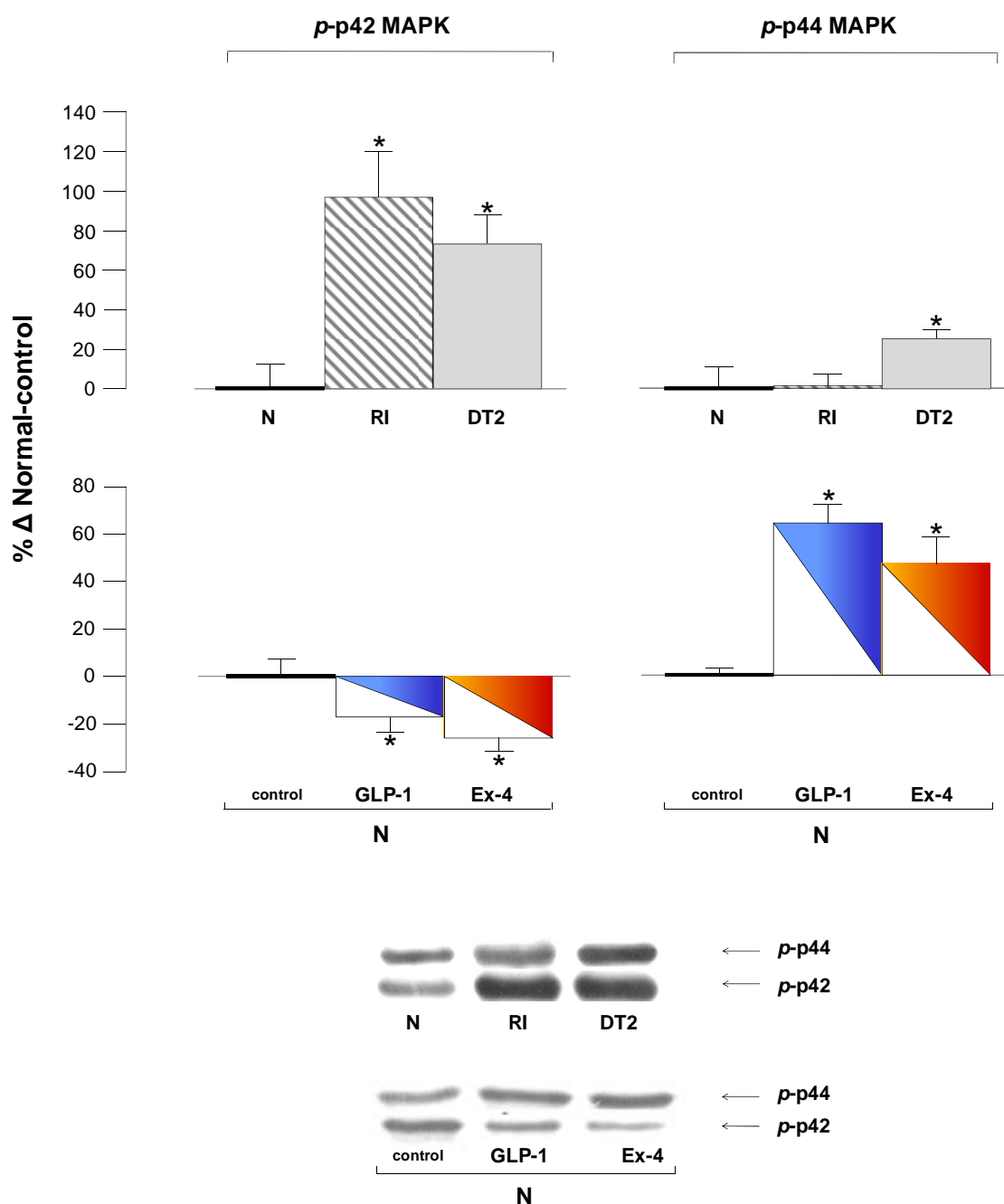
tratamiento con GLP-1 (n=4) y Ex-4 (n=5). Los resultados están expresados bien en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control o sobre el de N.

En el grupo RI, la actividad PI3K del músculo (**Fig. 13**) fue indistinta de la de la rata normal, mientras que en el DT2 resultó ser más baja ( $69 \pm 7\%$  N,  $p < 0,05$ ), confirmándose en este último caso resultados previos de nuestro laboratorio [Arnés, 2008]. El tratamiento tanto con GLP-1 como con Ex-4 indujo un aumento claro en la actividad del enzima en la rata normal (GLP-1:  $262 \pm 47\%$  N,  $p < 0,05$ , y Ex-4:  $173 \pm 15$ ,  $p < 0,05$ ) y también (**Fig. 14**) en el músculo de la RI (media conjunta:  $144 \pm 5\%$  RI,  $p < 0,001$ ); en el grupo DT2, se produjo un claro aumento tras tratamiento tanto con GLP-1 ( $115 \pm 5\%$  DT2-control) como con Ex-4 ( $172 \pm 16\%$  DT2,  $p < 0,05$ ), el cual, en el caso de la Ex-4, resultó en un valor aparentemente mayor que el de la rata normal ( $132 \pm 12\%$  N). Este efecto estimulador *in vivo* tanto de la Ex-4 como del GLP-1 en el musculo de la rata diabética tipo 2 difiere, en el caso del GLP-1, de los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio en experimentos realizados *in vitro* [Arnés y col., 2008], en los que no se había detectado modificación alguna del valor control.

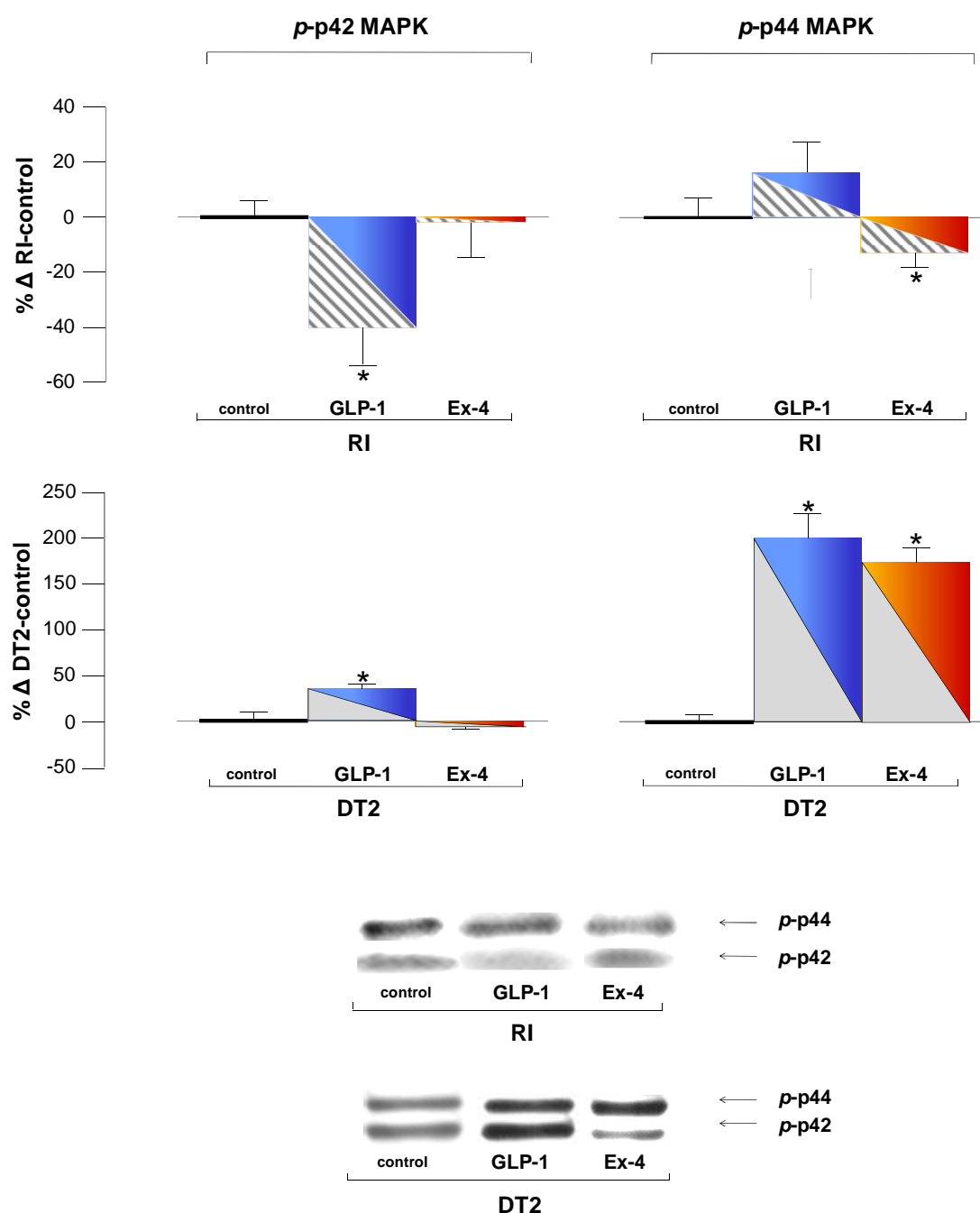
### MAPKs

Las **figuras 15 y 16** ilustran el grado de fosforilación ( $p$ -) de la p42 y p44 MAP quinasas en el músculo esquelético de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI, n=6) y diabética tipo 2 (DT2, n=8), respecto a la normal control (N, n=8), y el efecto del tratamiento con GLP-1 (n=4-8) y Ex-4 (n=4-8). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de N, o sobre el de su propio grupo control.

En el músculo de la rata RI (**Fig. 15**), el valor de  $p$ -p42 fue significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) que en la rata normal, mientras que el grado de fosforilación de la p44 resultó no ser distinto; sin embargo, en el grupo DT2, ambas isoformas mostraron estar hiperactivadas ( $p < 0,05$ , o menor), en mayor medida la p42. El tratamiento de la rata normal con GLP-1, y también con Ex-4, indujo un ligero (**Fig. 15**), pero significativo, descenso ( $p < 0,05$ , o menor) en el grado de fosforilación de la p42 MAPK, y un aumento claro en la actividad de la p44 ( $p < 0,02$ ). Esta acción reductora del GLP-1 sobre la p42 en el músculo de la rata normal también se detectó (**Fig. 16**) en el grupo RI ( $p < 0,05$ ), en tal medida, en este caso, que el nivel resultante ( $116 \pm 11\%$  N) llegó a ser indistinguible de el del músculo de la rata normal; sin embargo, no se detectó efecto



**Figura 15.** Actividad (p-) p42/p44 MAPK, en el músculo esquelético de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) en la rata N. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-8 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blot representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control.



**Figura 16.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad (p-) p42/p44 MAPK, en el músculo esquelético de la rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blots representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2 control.

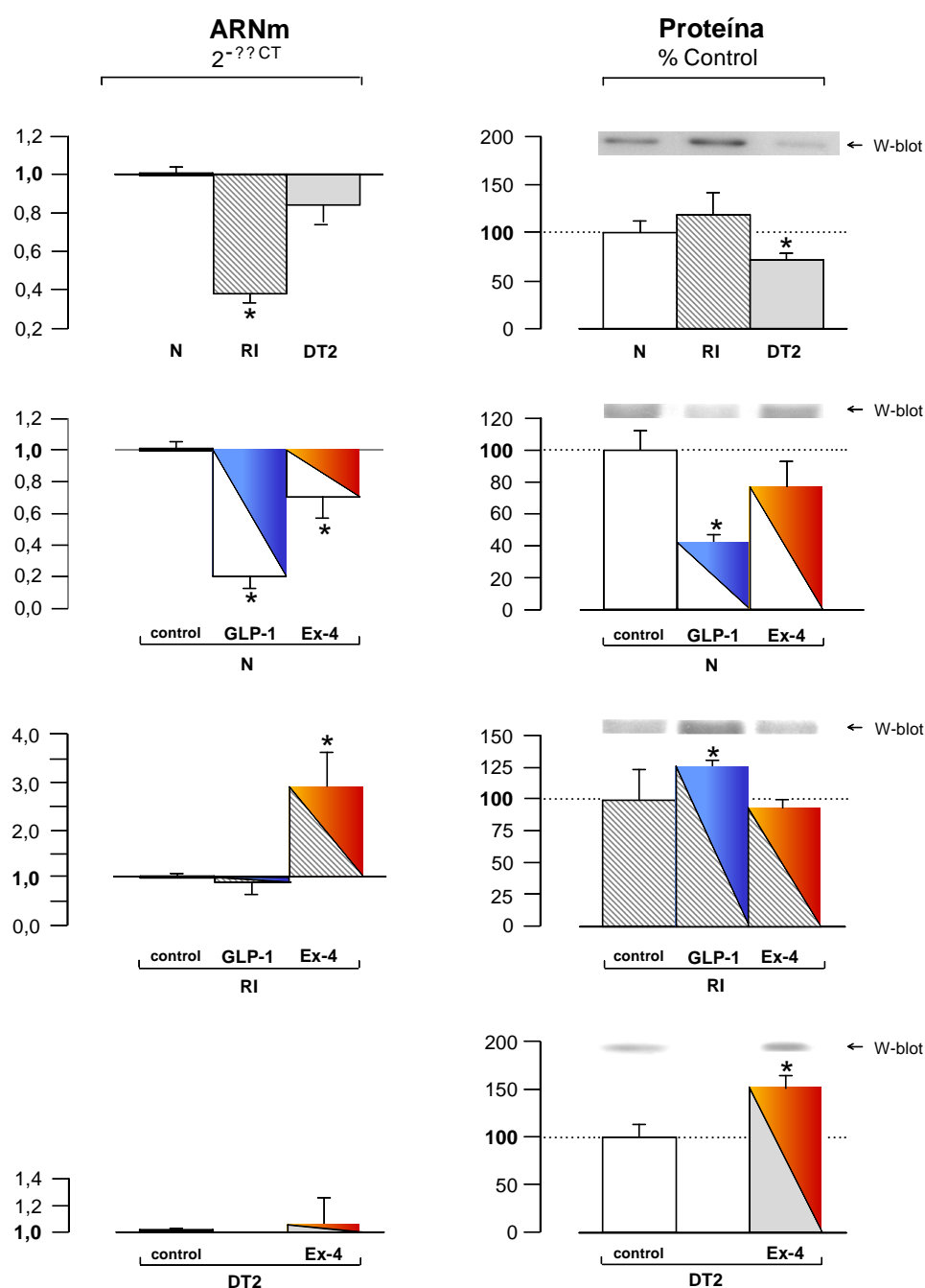
alguno sobre la p44 en este modelo de resistencia a insulina; la Ex-4, a diferencia con el GLP-1, no alteró (**Fig. 16**) el grado de fosforilación de la p42, pero sí redujo ligeramente el de la p44 MAPK por debajo de lo normal ( $74\pm5\%$  N,  $p<0,05$ ). En la rata DT2, en contraposición con el grupo RI, el GLP-1 incrementó aun más la actividad tanto de la p42 ( $233\pm5\%$  N,  $p<0,01$ ) como de la p44 ( $375\pm33\%$  N,  $p<0,001$ ); sin embargo, mientras la Ex-4 no modificó, como en la RI, el grado de fosforilación de la p42, este péptido incrementó, en gran medida, al igual que el GLP-1, el de la p44 MAPK ( $343\pm20\%$  N,  $p<0,001$ ).

#### **8. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el TEJIDO ADIPOSO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

La **figura 17** muestra los niveles de transcripción (ARNm) y traducción (proteína) del gen del GLUT-4, en el tejido adiposo de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=5-8$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=5$ ) respecto a la normal control (N,  $n=5-13$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 de la rata N ( $n=5-8$ ) y RI ( $n=4-5$ ), y con Ex-4 ( $n=6-9$ ) de los mismo grupos y, también, de la DT2 ( $n=8$ ). Los resultados están expresados en relación al valor de su propio grupo control o al del grupo N, bien en porcentaje –proteína– o cantidad relativa –ARNm–.

El ARNm del GLUT-4 en la rata RI mostró estar sensiblemente reducido respecto al del tejido adiposo de la rata normal ( $0,38\pm0,04$  veces-N,  $p<0,001$ ), sin alteración en la cantidad de proteína del glucotransportador; sin embargo, en la DT2, mientras que la expresión génica fue normal, el valor de su proteína era menor ( $p<0,05$ ), tal y como ya habíamos observado previamente [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]. El tratamiento prolongado de la rata normal con GLP-1 produjo un descenso ( $p<0,02$ ) en la expresión génica global del GLUT-4 –ARNm y proteína–, confirmándose, en el caso de la proteína, resultados previos [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]; esta acción reductora del GLP-1 fue también detectada, aunque en menor medida, en la Ex-4, si bien su efecto sobre la proteína no alcanzó significación estadística. En el grupo RI, el GLP-1 no modificó, aparentemente, el valor reducido inicial del ARNm, pero sí incrementó, por encima de lo normal, la cantidad de proteína-GLUT-4 ( $149\pm6\%$  N,  $p<0,01$ ); la Ex-4, sin embargo, y a diferencia con el GLP-1, aumentó sensiblemente el ARNm ( $p<0,05$ ), hasta un valor próximo al del tejido adiposo de la rata normal ( $0,79\pm0,17$  veces-N). En la





**Figura 17.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la expresión de GLUT-4 - ARNm y proteína -, en el tejido adiposo de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 5-13 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o RI control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blot representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs control.

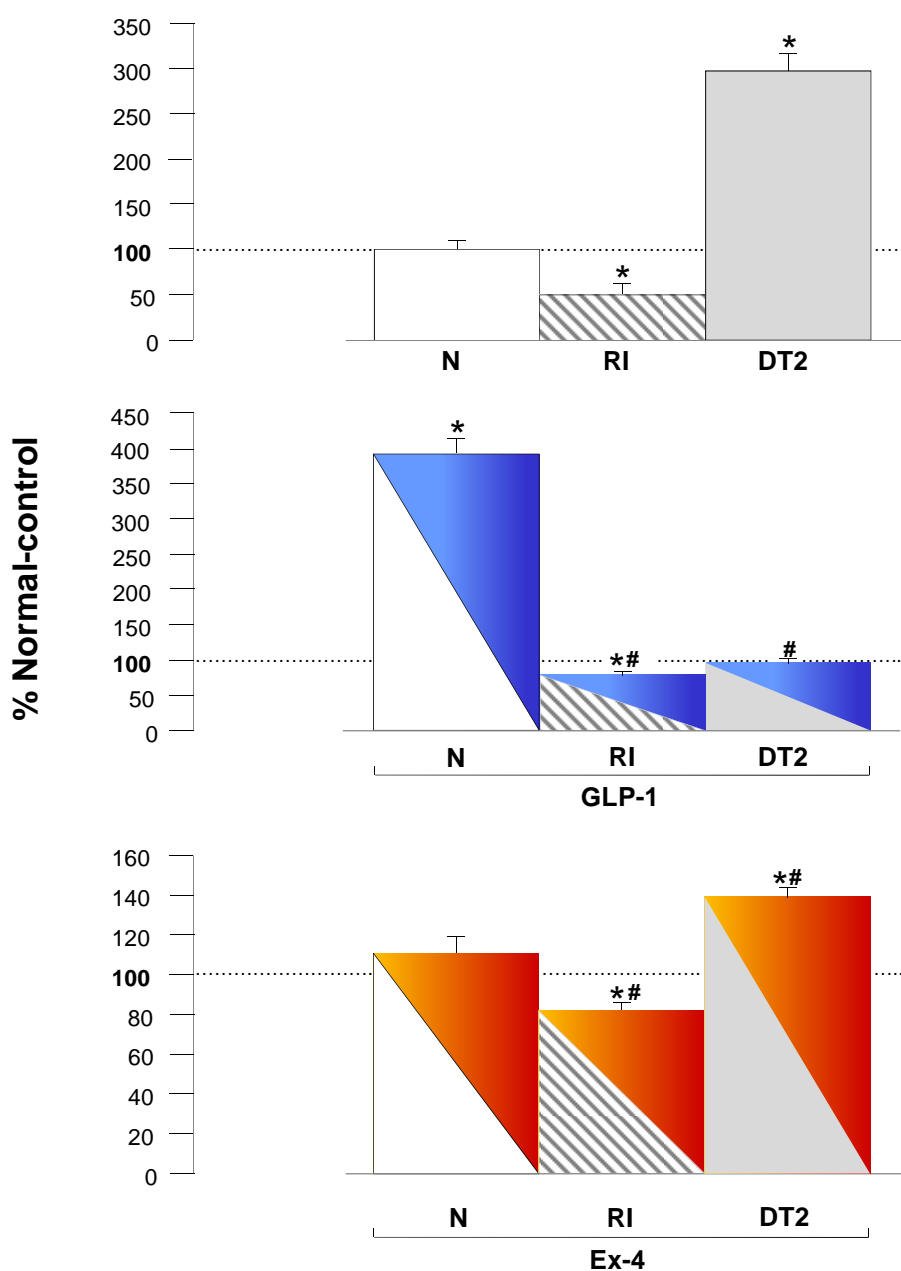
rata DT2, la Ex-4 no pareció afectar el nivel del ARNm, pero claramente incrementó ( $p<0,05$ ), hasta valores normales, la concentración de proteína ( $109\pm 9\%$  N), emulando con ello el efecto previamente observado del GLP-1 [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001].

La **tabla 1 (pág. 43)** refleja las diferencias cualitativas en la expresión del GLUT-4 –ARNm y proteína– en los dos modelos experimentales, RI y DT2, respecto a la rata N, y los cambios en los tres grupos –N, RI y DT2– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

#### **9. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre el TRANPORTE de GLUCOSA, en el ADIPOCITO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

En la **figura 18** está representado el transporte de glucosa en el tejido adiposo de la rata control –obtenida por tratamiento con salino– resistente a insulina (RI,  $n=6$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=4$ ), respecto a la control normal (N,  $n=12$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 ( $n=4-8$ ) y Ex-4 ( $n=4-6$ ). Los resultados están expresados en porcentaje del valor del grupo N control.

En el adipocito aislado de la rata RI, el transporte de glucosa ( $8,10\pm 0,49$  fmol/ $10^5$  células) fue sensiblemente menor ( $p<0,01$ ) que en el de la rata normal ( $15,1\pm 1,6$ ); a pesar de ello, la célula mantuvo su capacidad de respuesta *in vitro* a insulina  $10^{-9}$  M –no mostrado en la figura–, con la que se produjo un incremento ( $35\pm 9\%$   $\Delta$  RI-basal,  $n=7$ ,  $p<0,01$ ) que si bien no alcanzó el valor del transporte de glucosa en la rata normal, sí se aproximó ( $73\pm 4\%$  N-basal,  $p<0,01$ ). El valor de captación del azúcar en el grupo DT2 resultó ser mucho mayor de lo normal ( $45,0\pm 2,7$  fmol/ $10^5$  células,  $p<0,001$  vs N), confirmando el resultado previo de nuestro laboratorio [Sancho y col., 2005]; no obstante, la insulina  $10^{-9}$  M produjo un incremento *in vitro*, que si bien fue de magnitud similar al inducido por la hormona en la célula de la rata normal, resultó, en realidad, en un valor neto muy por encima (no mostrado). El tratamiento de la rata normal con GLP-1 activó, de forma clara, la captación de la hexosa ( $p<0,001$ ), mientras que la Ex-4 no mostro tener efecto. En el grupo RI, tanto el GLP-1 como la Ex-4 indujeron un incremento en el transporte del azúcar (ambos,  $p<0,05$  vs RI), hasta valores que si bien no alcanzaron la normalidad ( $p<0,02$  vs N), sí resultaron ser muy próximos. En el grupo DT2, el tratamiento con GLP-1, y también con Ex-4, tuvo un claro efecto reductor y, por tanto



**Figura 18.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre el transporte de glucosa, en el adipocito de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-12 ratas, están expresados en porcentaje del valor del grupo N control tratado con salino. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control; #  $p < 0,05$ , o menor, vs control respectivo, RI o DT2.

normalizador (GLP-1:  $14,5 \pm 0,9$  fmol/ $10^5$  células, y Ex-4:  $20,9 \pm 1,7$ ; ambos,  $p < 0,001$  vs DT2), si bien en el caso de la Ex-4 el valor resultante aun permaneció ligeramente por encima de el del adipocito de la rata normal ( $138 \pm 11\%$  N,  $p < 0,05$ ).

La **tabla 2 (pág. 46)** refleja las diferencias cualitativas en el transporte de glucosa en los dos modelos experimentales, RI y DT2, respecto a la rata N, y los cambios en los tres grupos –N, RI y DT2– tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4, respecto a su propio control tratado con salino.

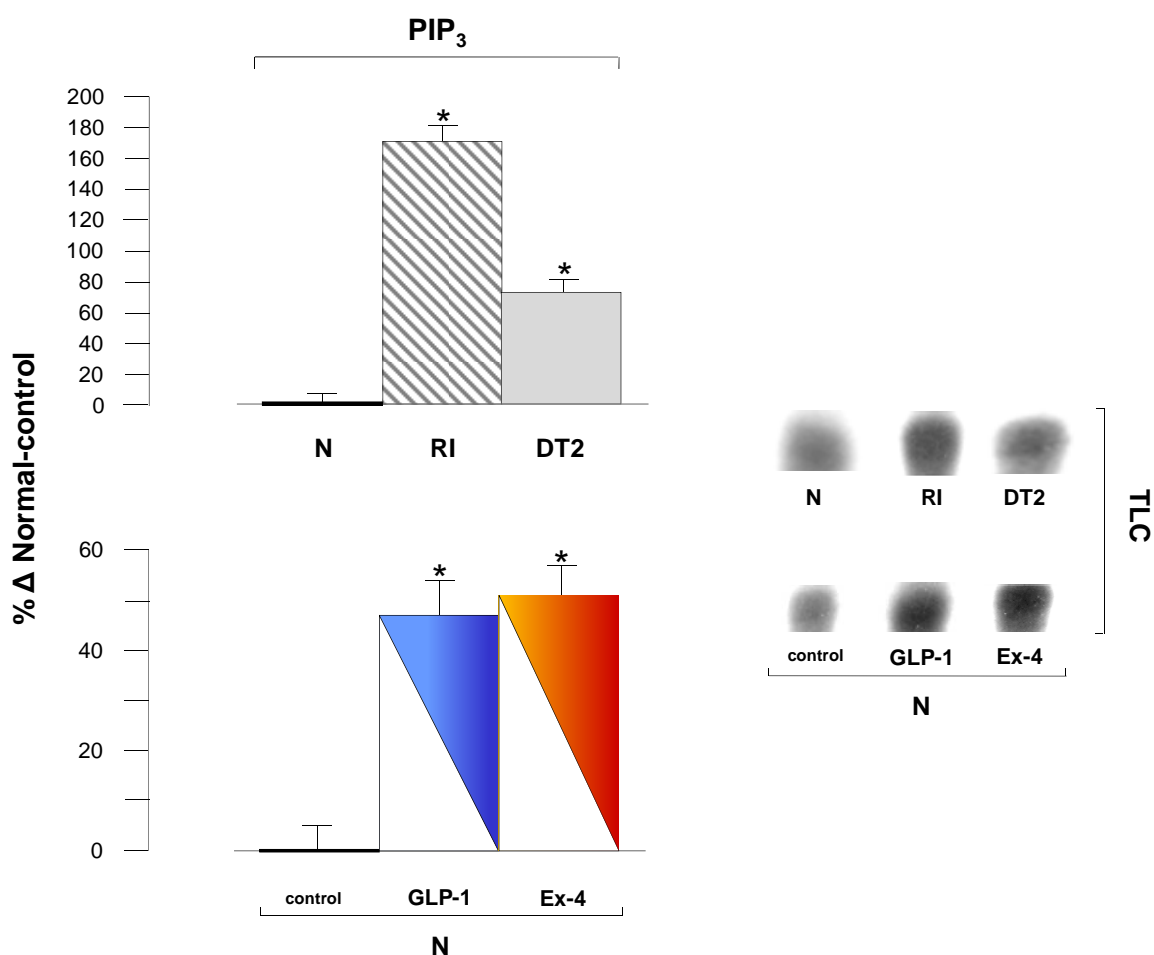
#### **10. EFECTO del TRATAMIENTO con GLP-1 y Ex-4 sobre la actividad de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN CELULAR, en el TEJIDO ADIPOSO de la rata NORMAL, RESISTENTE a INSULINA y DIABÉTICA TIPO 2**

En este trabajo, hemos estudiado la actividad de la PI3K y de las MAPKs, porque son enzimas punta de lanza en los mecanismos de señalización celular, y por estar éstas implicadas en varias de las acciones del GLP-1 y de la Ex-4 sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos.

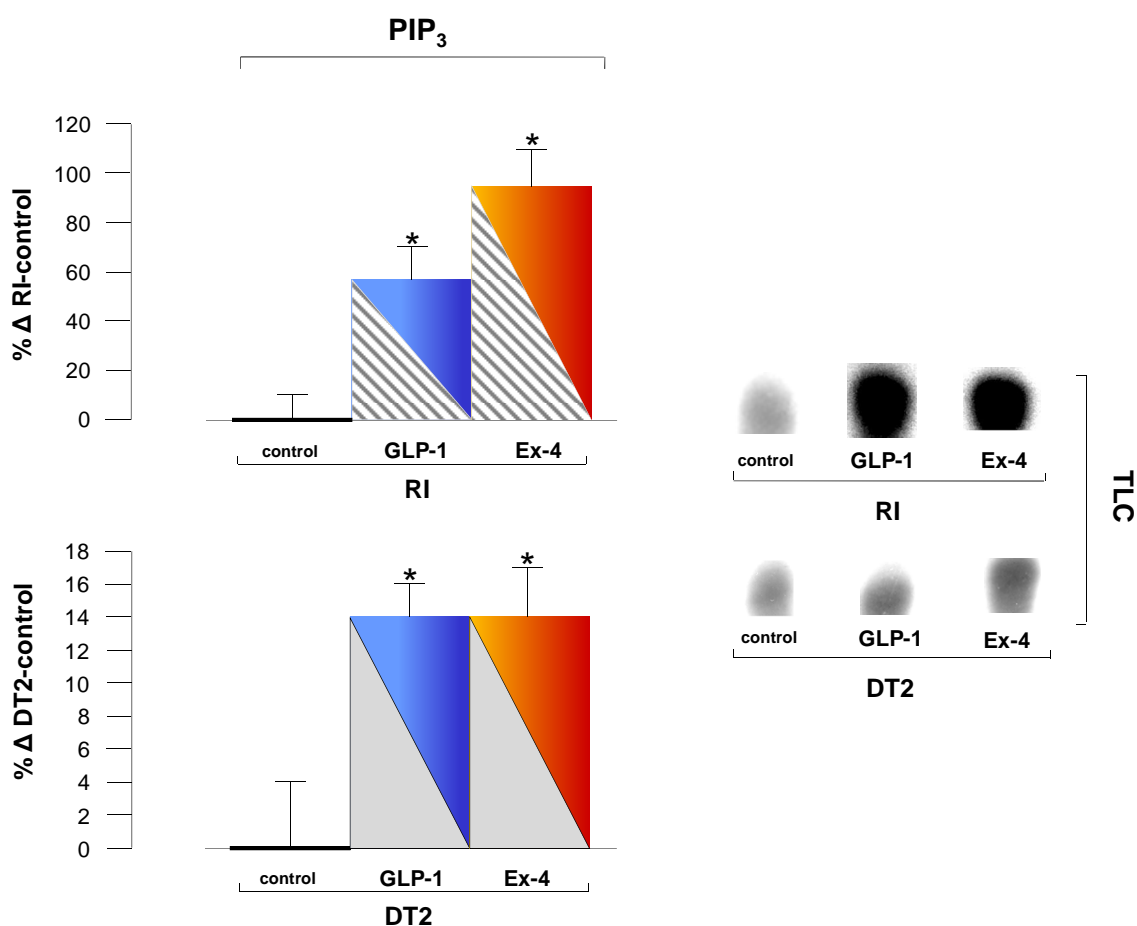
##### **PI3K**

Las **figuras 19 y 20** ilustran la cantidad de  $PIP_3$  formado desde  $PIP_2$ , en el tejido adiposo de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=8$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=3$ ), respecto a la normal control (N,  $n=5$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 ( $n=4$ ) y Ex-4 ( $n=4$ ). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control o sobre el de N.

En el tejido adiposo de la rata RI, la actividad PI3K – $PIP_3$ – resultó ser mucho mayor (**Fig. 19**) que la de la rata normal ( $269 \pm 10\%$  N,  $p < 0,001$ ), al igual que en el grupo DT2 ( $172 \pm 7\%$  N,  $p < 0,01$ ), con lo que se confirma, en este último caso, observaciones previas de nuestro laboratorio [Sancho y col., 2005]. Tanto el tratamiento con GLP-1 como con Ex-4 produjo un estímulo en la actividad de la enzima, no sólo en la rata normal (media conjunta:  $149 \pm 7\%$  N,  $p < 0,01$ ) sino también (**Fig. 20**) en el grupo RI (media conjunta:  $176 \pm 14\%$  RI,  $p < 0,01$ ). En la rata DT2, si bien la célula conservó su capacidad de respuesta al GLP-1 y Ex-4, el efecto estimulador respectivo (media conjunta:  $114 \pm 3\%$  DT2,  $p < 0,01$ ) resultó ser inferior al inducido en la rata RI ( $p < 0,01$ ).



**Figura 19.** Actividad PI3K –PIP<sub>3</sub>– en el tejido adiposo de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) en la rata N. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control.

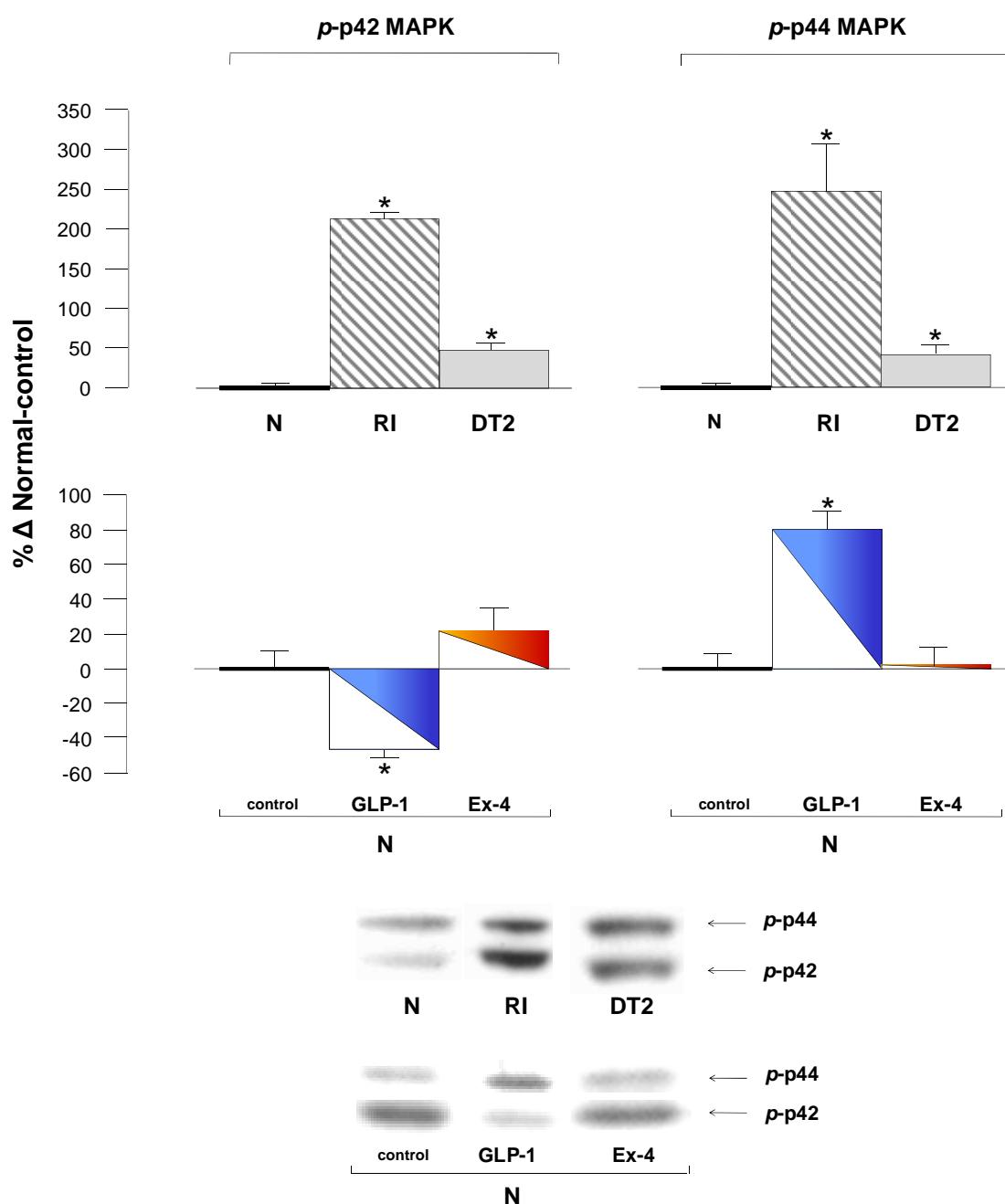


**Figura 20.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad PI3K –PIP<sub>3</sub>–, en el tejido adiposo de la rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 3-8 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a TLCs representativas. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2.

## MAPKS

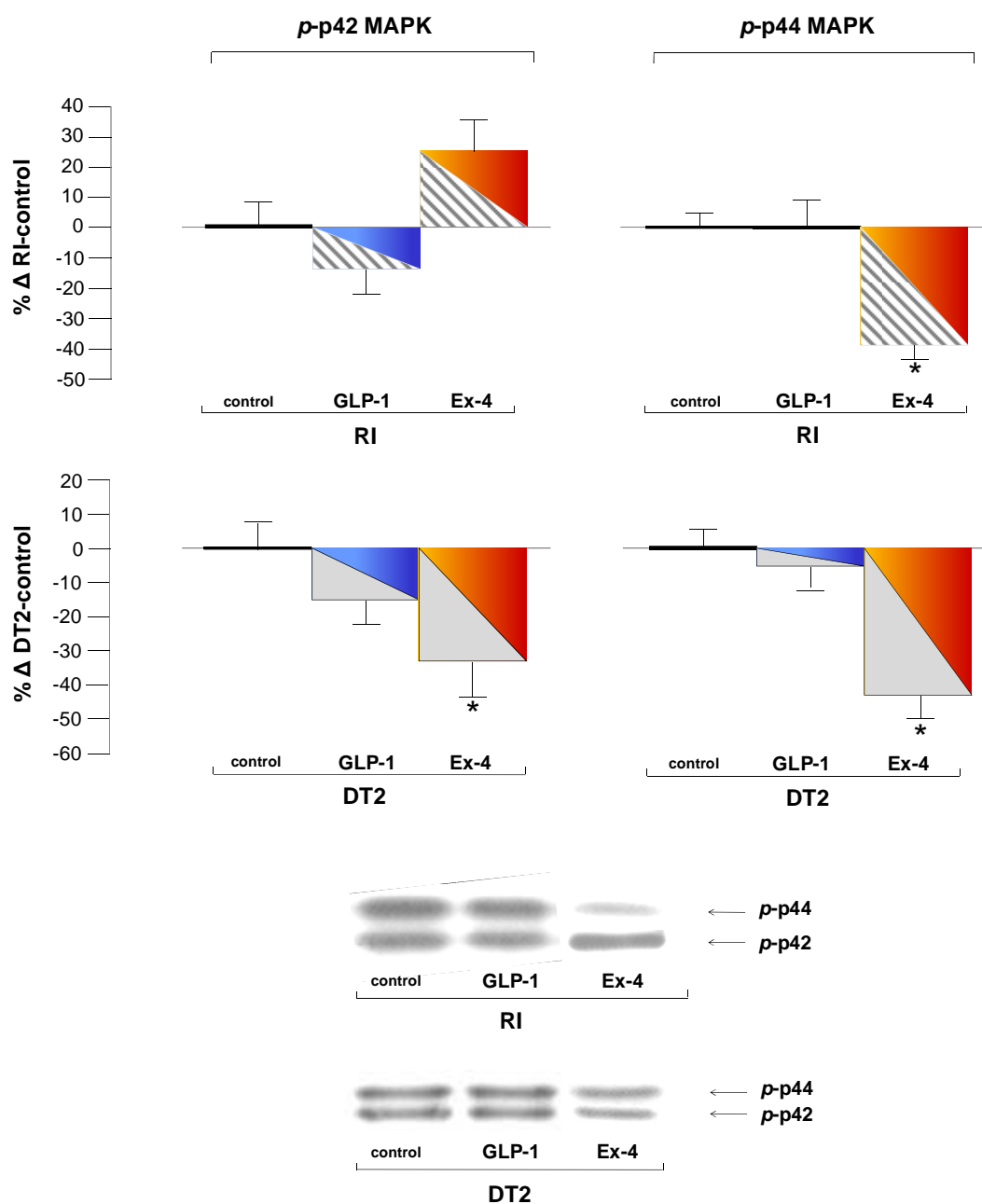
Las **figuras 21** y **22** ilustran el grado de fosforilación ( $p$ -) de la p42 y p44 MAP quinasa en el tejido adiposo de la rata control –tratada con salino– resistente a insulina (RI,  $n=6-9$ ) y diabética tipo 2 (DT2,  $n=4-7$ ), respecto a la normal control (N,  $n=4-8$ ), y el efecto del tratamiento con GLP-1 ( $n=4-6$ ) y Ex-4 ( $n=4-5$ ). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de N, o sobre el de su propio grupo control.

En la rata RI ( $n=6$ ), el grado de fosforilación (**Fig. 21**), tanto en la p42 MAPK como de la p44, fue mayor (ambos,  $p<0,02$ ) que en el tejido adiposo de la rata normal, y también fue mayor, aunque en menor medida, en el grupo DT2 (ambos,  $p<0,05$ ), confirmándose en este último caso resultados previos de nuestro laboratorio [Sancho y col., 2005]. En el grupo normal (**Fig. 21**), el GLP-1 indujo un descenso en la actividad de la p42 MAPK ( $p<0,01$ ) y un incremento en la de p44 ( $p<0,01$ ), mientras que la Ex-4 no pareció tener efecto sobre ninguna de las dos enzimas, excepto por un ligero aumento, sin significación estadística, en la p42. En la rata RI, el GLP-1 mostró (**Fig. 22**) una acción tendente hacia la reducción de la sobreactividad inicial de la p42 MAPK, sin modificación clara del grado de fosforilación de la p44; sin embargo, mientras que el tratamiento con Ex-4 no alteró el nivel de actividad de la p42, sí redujo, considerablemente, el de la p44 ( $211\pm 17\%$  N,  $p<0,01$ ). En la rata DT2, el GLP-1 inhibió (**Fig. 22**) la actividad de la p42 MAPK hasta valores normales ( $111\pm 9\%$  N), sin alterar, como en el caso de la RI, el grado de fosforilación de la p44, tal y como ya habíamos observado previamente [Sancho y col., 2005]; la Ex-4, sin embargo, mostró tener un efecto reductor claro sobre la actividad global de las MAPKs ( $p<0,05$ , o menor), llegando a alcanzar, ambas isoformas, valores normales ( $p$ -p42:  $98\pm 2\%$  N, y  $p$ -p44:  $80\pm 8\%$ ).



**Figura 21.** Actividad (*p*-) p42/p44 MAPK, en el tejido adiposo de la rata normal (N, □), resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▤), y efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) en la rata N. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor del grupo N control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blot representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs N control.





**Figura 22.** Efecto del tratamiento sostenido con GLP-1 (■) y Ex-4 (■) sobre la actividad (*p*-) p42/p44 MAPK, en el tejido adiposo de la rata resistente a insulina (RI, ▨) y diabética tipo 2 (DT2, ▩). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-9 ratas, están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor de su propio grupo control tratado con salino, y mostrados junto a Western-blots representativos. \*  $p < 0,05$ , o menor, vs RI o DT2 control.

## DISCUSIÓN

La participación directa del GLP-1 en el control del metabolismo de la glucosa y lípidos en tejidos extrapancreáticos de la rata y del hombre, está ampliamente documentada [Ruiz-Grande y col., 1992; Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a; Morales y col., 1997; Perea y col., 1997; Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001a; Luque y col., 2002; D'Alessio y col., 2004]; también se ha demostrado que el GLP-1 ejerce las acciones mencionadas a través de receptores específicos que, al menos en el músculo [Delgado y col., 1995] y en el hígado [Villanueva-Peñacarrillo col., 1995], parecen ser distintos, en estructura y/o función, a su receptor pancreático, al no inducir en ellos un incremento en la formación de AMPc [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a; Morales y col., 1997; Yang y col., 1998], tal y como ocurre en el páncreas [Thorens, 1992]. El tejido adiposo, sin embargo, donde este péptido tiene una doble acción, lipolítica y lipogénica [Perea y col., 1997], se piensa que, muy probablemente, dispone de dos receptores distintos: uno similar o igual al pancreático, porque estimula la formación de AMPc [Drucker y col., 1987; Ruiz-Grande y col., 1992], y otro relacionado con el receptor para GLP-1 en el hígado [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995] y músculo esquelético [Delgado y col., 1995], en el que un IPG [Galera y col., 1996; Trapote y col., 1996; Marquez y col., 1998; 2001; Luque y col., 2002] sería, como en el caso de la insulina, uno de sus segundos mensajeros.

El GLP-1 no sólo activa el transporte de glucosa, sino también la glucogénesis en el hígado, músculo y tejido adiposo, a través de un incremento en la actividad de la glucógeno sintasa *a* [Valverde y col., 1994; Morales y col., 1997; Villanueva Peñacarrillo y col., 1994; Perea y col., 1997; Sancho y col., 2005], y se ha demostrado que todos estos efectos dependen de un incremento en la actividad de ciertas quinasas [Redondo y col., 2003; Acitores y col., 2004; Sancho y col., 2005]. Además, hace ya unos años se informó de que el GLP-1, en tratamiento sostenido, ejerce un control sobre el glucotransportador mayoritario en el hígado, músculo y tejido adiposo en estado normal y diabético tipo 2 y tipo 1, incidiendo en su proceso de transcripción y/o traducción [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b].

Por otro lado, la Ex-4, que como el GLP-1 tiene un efecto antidiabético incluso más sostenido y potente [Young y col., 1999; Greig y col., 1999], comparte con él muchas de sus acciones en tejidos extrapancreáticos [Alcántara y col., 1997; Sancho y col., 2005; Arnés y col.,

2009], incluida aquella sobre el metabolismo del hueso, en el que ambos, GLP-1 y Ex-4, han mostrado activar su metabolismo [Nuche y col., 2009; Nuche y col., 2010b], acción que, en el caso del GLP-1, es ejercida, posiblemente, a través de un receptor específico [Nuche y col., 2010a] de nuevo distinto al pancreático.

El efecto insulínico y glucoregulador de la Ex-4 se ha afirmado que ocurre a través del receptor pancreático para GLP-1 [Göke y col., 1993a]. Ello está basado en resultados obtenidos en modelos animales con el receptor pancreático para GLP-1 silenciado, y que han sugerido que éste está involucrado en la acción incretina/insulínica tanto del GLP-1 como de la Ex-4, y también en la glucosensorial en la vena porta del GLP-1 [Edwards y col., 1999; Burcelin y col., 2001]. Pero además, y al margen del hecho probado de que la Ex-4 se une al receptor pancreático del GLP-1 [Raufman y col., 1992; Göke y col., 1993a], también se sabe que desplaza, en cierta medida, la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana en el músculo esquelético [Arnés y col., 2008]. Sin embargo, aunque la Ex-4 y el GLP-1 parecen compartir ciertas acciones destinadas a una reducción del azúcar cuando ésta circula en exceso, podría ser, como de hecho se ha comprobado en otros tejidos, que no todas las de la Ex-4 sean predecibles en base a la farmacología conocida del GLP-1 [Idris y col., 2002]

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la acción sostenida del GLP-1 y también de la Ex-4, sobre parámetros relacionados con el transporte y metabolismo de la glucosa en el hígado, músculo y tejido adiposo, no sólo en un modelo experimental de diabetes tipo 2 en la rata, sino también en otro de resistencia a insulina, ésta última como situación previa que conduce, con el tiempo, y en función del individuo, a la manifestación de un deterioro en la homeóstasis del azúcar.

El hígado del modelo RI de este trabajo presentó una expresión génica del GLUT-2 –ARNm y proteína– significativamente menor de lo normal; sin embargo, previamente se había observado en un grupo de ratas DT2, que si bien el contenido en proteína también era más bajo, el de ARNm era mayor [Arnés y col., 2008]. Esta subexpresión del gen del GLUT-2 en la rata RI fue acompañada de un contenido en glucógeno hepático sensiblemente menor de lo normal, y también fue menor el del hígado de un nuevo grupo de ratas DT2 incluido en este estudio, confirmándose, en este último caso, resultados previos [Arnés y col., 2008]. El tratamiento prolongado tanto con GLP-1 como con Ex-4 incrementó en gran medida tanto el ARNm como el contenido de proteína del

GLUT-2, hasta valores, en ambos modelos experimentales, muy por encima de los de la rata normal. Esta estimulación del gen del GLUT-2 en la rata RI tras GLP-1 o Ex-4, fue acompañada de un incremento en el glucógeno hepático, que alcanzó valores prácticamente normales con ambos péptidos; en la rata DT2, el GLP-1 también aumentó la cantidad de glucógeno, incluso por encima del de la rata normal, y de igual manera a lo observado previamente en este mismo modelo tras tratamiento con Ex-4 [Arnés y col., 2008]. Los previos y estos resultados sugieren un efecto directo de la Ex-4 sobre la captación de glucosa por el hígado. Sin embargo, deben tenerse en cuenta evidencias de un trabajo reciente [Vahl y col., 2007], el cual demuestra la presencia de receptores para GLP-1 en los nervios terminales de la vena porta; y si bien se desconoce cuál es el primer paso en la acción de la Ex-4 en el hígado, la posibilidad, por su amplia homología con el GLP-1, de que su efecto este mediado y regulado por el sistema nervioso central, no debe ser descartada.

La subexpresión del GLUT-2 y el menor contenido en glucógeno del hígado tanto del modelo RI como del DT2, fue acompañado, sin embargo, de una sobreactividad de la PI3 quinasa, como desarrollo, quizás, de un mecanismo corrector de esa alteración. No obstante, tanto el tratamiento con GLP-1 como con Ex-4 estimuló aun más la actividad del enzima, sugiriendo su independencia en la acción de posibles estímulos, y la importancia de su participación en el restablecimiento del proceso deteriorado del metabolismo de la glucosa en el hígado. En el caso de las MAP quinasas, sin embargo, de las que tanto la p42 como la p44 están sobreactivadas en el hígado de ambos modelos, RI y DT2, el tratamiento con GLP-1 incrementó aun más sólo el valor de *p*-p42 en la RI y el de *p*-p44 en la DT2, mientras que la Ex-4 no tuvo efecto, sugiriendo un mecanismo de acción distinto para cada uno de estos dos péptidos tras el acceso de la glucosa al hepatocito.

De todo lo anterior se puede afirmar que la Ex-4 controla la expresión del glucotransportador y el acumulo de glucógeno en el hígado, tanto en la rata normal como en la resistente a insulina y diabética, de la misma manera a lo observado en este trabajo y en previos sobre el GLP-1 en el hígado de la rata normal y diabética [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b; Arnés y col., 2009]. Y no sólo eso, sino que los resultados sugieren que aunque otros tejidos extrapancreáticos puedan participar, es sin duda el

hígado una diana importante en la acción glucoreguladora de la Ex-4 en estado diabético.

La expresión del glucotransportador GLUT-4 en el músculo esquelético del modelo RI, a diferencia del hígado, mostró ser mayor de lo normal, y ambos parámetros –ARNm y también proteína– se vieron aun más incrementados tras tratamiento tanto con GLP-1 como con Ex-4. Esta sobreexpresión del glucotransportador puede ser debida al desarrollo de un mecanismo de respuesta frente a un metabolismo de la glucosa deteriorado en esta situación de resistencia a insulina, porque, de hecho, tanto la captación del azúcar como la actividad GSa también están reducidas en este modelo. Por otro lado, la acción hiperactivadora del GLP-1 y Ex-4 sobre la expresión el GLUT-4 fue acompañada de la normalización en el transporte de glucosa tras ambos péptidos, y también del nivel de GSa en el caso del GLP-1; sin embargo, la Ex-4, si bien incrementó ligera pero significativamente la actividad GSa, el valor alcanzado tras tratamiento con este péptido permaneció por debajo de lo normal. Estos paralelismos en la acción respectiva del GLP-1 y Ex-4, sólo hasta cierto punto del proceso de metabolización del azúcar, indican que si bien la Ex-4 mimetiza al GLP-1 en muchos de sus efectos [Alcántara y col., 1997; Luque y col., 2002], el mecanismo que conduce a los mismos no siempre es común. Concretamente, se sabe, por un lado, que el GLP-1 ejerce su acción en el músculo a través de un receptor específico, no asociado al sistema adenilatociclasa [Delgado y col., 1995], en el que un IPG parece ser uno de sus segundos mensajeros [Marquez y col., 1998; Luque y col., 2002]; por otro, la Ex-4, sobre la cual no se ha podido describir hasta el momento un receptor propio en ninguno de los tejidos de mamíferos estudiados, se ha demostrado que tampoco afecta al contenido de AMPc en el músculo, como es el caso del GLP-1, pero que también activa la generación de IPGs. Sin embargo, la Ex-4, si bien desplaza la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana en el músculo [Arnés y col., 2008], lo hace con mucha menor potencia, lo que indica que, para la consecución de su efecto, la Ex-4 podría estar utilizando parcialmente el receptor del GLP-1, pero no sólo éste.

El transporte de glucosa en el músculo de la rata DT2, a diferencia de lo que ocurre en la RI de este estudio, no fue aparentemente distinto del de la normal; pero en un grupo de ratas de este mismo modelo DT2 previamente estudiado [Arnés y col., 2009], el valor era ligeramente menor, coincidiendo con lo observado también en otros trabajos

realizados en células musculares de pacientes diabéticos tipo 2 [Gonzalez y col., 2005b]; sin embargo, la actividad GSa en los dos modelos experimentales del presente estudio, está reducida. Estos valores iniciales de TG y GSa en el músculo de la rata DT2 se sabe van acompañados de un nivel aparentemente normal de ARNm del GLUT-4, y sólo ligeramente menor de la proteína [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b; Arnés y col., 2009]. El tratamiento con GLP-1 de la rata DT2 (presente estudio) no modificó ninguno de los dos parámetros, TG o GSa, mientras que previamente se había informado sobre un incremento en la expresión del GLUT-4 tras GLP-1 [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b].

En relación a la Ex-4, previamente no se había podido detectar un efecto *in vitro* sobre la GSa o transporte de glucosa en el músculo de este mismo modelo diabético [Arnés y col., 2008], ni tampoco en la expresión del GLUT-4 tras tratamiento con el péptido [Arnés y col., 2009]; en el músculo de la rata normal, sin embargo, la Ex-4 estimula *in vitro* el transporte de glucosa en igual medida que el GLP-1 [Arnés y col., 2008]. No obstante, se ha observado que tras tratamiento sostenido de la rata DT2 con Ex-4, se produce un incremento significativo en el valor de captación del azúcar, aumento que no se detecta en la rata normal [Arnés y col., 2009].

Tomando en consideración todas las observaciones realizadas *in vivo* e *in vitro* sobre el efecto de la Ex-4, éstas sugieren que el músculo esquelético puede que participe en su acción glucoreguladora, pero que en estado diabético la intervención de este tejido no sería determinante.

Las alteraciones detectadas en el glucotransportador, transporte de glucosa y actividad GSa en el músculo de los dos modelos experimentales de este trabajo, fueron acompañadas de un valor normal de actividad PI3K en el grupo RI, y disminuido en el DT2, que aumenta en ambos tras tratamiento con GLP-1 o Ex-4, normalizándose en el caso de las DT2. Sin embargo, mientras que la actividad inicial p42 MAPK fue mucho mayor de lo normal en ambos grupos experimentales, la de p44 resultó ligeramente más alta sólo en la rata DT2, confirmándose con ello observaciones previas [Arnés y col., 2008]. El tratamiento con GLP-1 tuvo, en general, un efecto reductor y normalizador, sobre todo en la sobreactividad de la p42 del músculo de la rata RI, mientras que la Ex-4 ejerció una acción tendente hacia la normalización sólo sobre la p44 MAPK. En la rata diabética, sin embargo, ninguno de los dos péptidos parece modificar el valor inicialmente sobrepresado de la p42, pero ambos estimulan en gran medida la

actividad de la p44, tal y como se había observado previamente *in vitro* [Arnés y col., 2008]. La actividad PI3K reducida en el músculo de la rata DT2 de este estudio, difiere de resultados previos obtenidos en miocitos de pacientes diabéticos tipo 2 [González y col., 2005b], en los que se detectó un nivel del enzima más alto que en células de sujetos normales, todo ello indicando peculiaridades de acción específicas de especie. Por otro lado, trabajos realizados *in vitro* en el músculo esquelético de la rata normal [Acitores y col., 2005], y utilizando inhibidores de distintas quinasas, confirmaron que la PI3K y las MAPKs participan en el control del incremento en la captación del azúcar inducido por insulina; sin embargo, en cuanto al GLP-1, su dependencia de la PI3K en esa misma acción no es tan evidente, si bien está demostrado que un incremento en la actividad de este enzima es determinante en el efecto estimulador del GLP-1 sobre la glucógeno sintasa *a* en el músculo esquelético [Acitores y col., 2004] e hígado [Redondo y col., 2003] de rata, y también en células musculares del hombre [González y col., 2005a], indicando de nuevo diferencias dependientes de la especificidad del tejido en las características de acción del GLP-1.

En el tejido adiposo de la rata resistente a insulina de este trabajo, el valor de ARNm del GLUT-4 fue menor que el del grupo normal, sin alteración en la proteína; sin embargo, en el modelo DT2 se observó lo contrario, es decir, un ARNm normal y una proteína ligeramente reducida, confirmando resultados previos de nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b]. El tratamiento de la rata RI con Ex-4, pero no con GLP-1, normalizó los valores reducidos del ARNm en el tejido adiposo, mientras que en el caso de la proteína fue el GLP-1 el que indujo una estimulación significativa. En la rata diabética, la Ex-4 no modificó el valor de ARNm, pero normalizó el inicialmente reducido de proteína, al igual que lo previamente observado tras tratamiento con GLP-1 de este mismo modelo [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001b].

Estas alteraciones de expresión del glucotransportador en el tejido adiposo del modelo experimental de resistencia a insulina y diabetes tipo 2, resultaron en un valor de transporte de glucosa disminuido en la rata RI en relación al de la normal, y aumentado en la DT2, confirmando, esto último, resultados previos [Sancho y col., 2005]. El tratamiento con cualquiera de los dos péptidos, GLP-1 y Ex-4, tuvo un efecto normalizador de este parámetro en ambos modelos, algo menos potente el de la Ex-4 en la rata DT2.

El valor del transporte de glucosa en el adipocito de la rata diabética de este trabajo, aumentado respecto al de la normal, cursa en paralelo con una mayor actividad de la PI3K; en el grupo RI, sin embargo, que también muestra una hiperactividad de esta enzima, ello no va acompañado de una mayor captación de azúcar sino de un valor ligeramente reducido. En el adipocito de ambos modelos experimentales, se observa también una hiperactivación de las MAP quinasas. La participación de la PI3K y también de las MAPKs en el transporte y metabolismo de la glucosa y lípidos había sido postulada previamente en trabajos realizados en el tejido adiposo de la rata normal, y en el del mismo modelo de diabéticas tipo 2 del presente estudio [Sancho y col., 2005], así como en adipocitos de sujetos normales [Sancho y col., 2007]. De hecho, ambas, la PI3K y las MAPKs interviene, de forma determinante, en el efecto estimulador no sólo de la insulina sino también del GLP-1 y Ex-4 sobre el transporte de glucosa en el tejido adiposo de la rata y del hombre normal [Sancho y col., 2005; 2007] y obeso [Sancho y col., 2006]. En concordancia con lo anterior, el tratamiento con GLP-1 y Ex-4 de la rata RI, y también de la DT2 de este estudio, incrementa de forma clara la actividad PI3K en ambos modelos experimentales; sin embargo, la Ex-4 induce una disminución significativa en la p44 MAPK en el grupo RI, y de ambas isoformas, p42 y p44, en el DT2, tendente a su normalización, mientras que no se observa efecto alguno del GLP-1 sobre la actividad de las MAPKs en ninguno de los dos modelos.

Por lo anterior, el efecto normalizador del GLP-1 sobre el glucotransportador y también sobre el transporte de glucosa en el tejido adiposo de la rata diabética, no parece pueda ser atribuido a una acción de este péptido también sobre las MAPKs, con lo que cabría pensar que, en esta situación, pudieran activarse otros mecanismos. De hecho, se ha demostrado que en el adipocito de la rata normal, el GLP-1, como la insulina, la Ex-4 y también la Ex-9, estimulan no sólo la actividad de la PI3K sino, además, la de las MAPKs y P70s6K, pero no la PKB, la cual sólo es incrementada por insulina; sin embargo, la célula de la rata diabética desarrolla, aparentemente, un mecanismo extraordinario, por el cual un incremento en la actividad de la PKB es claramente visible tras la acción *in vitro* del GLP-1, Ex-4 y también Ex-9 [Sancho y col., 2005], o como también es el caso del valor de PI3K incrementado en el músculo de sujetos diabéticos tipo 2 [Meyer y col., 2002; Gonzalez y col., 2005b].



En resumen, de todos los resultados de este trabajo, podemos afirmar que los tres tejidos seleccionados, e involucrados en mayor o menor medida en el control de la homeostasis de la glucosa, presentan, tanto en la rata resistente a insulina como en la diabética tipo 2, alteraciones de parámetros propios del metabolismo del azúcar, bien en su captación, su señalización celular o metabolismo; también, los hallazgos demuestran que el tratamiento con ambos, GLP-1 y Ex-4, tiene un efecto positivo sobre alguno de ellos, que da como resultado un restablecimiento de la constante normal en muchos casos, y que podría justificar la demostrada acción glucoreguladora tanto del GLP-1 como de la Ex-4.

## **CONCLUSIONES**

**El modelo de resistencia a insulina y el de diabetes tipo 2, obtenidos respectivamente en la rata por sobrealimentación crónica con fructosa o tratamiento con estreptozotocina al nacer, presentan valores alterados en parámetros relacionados con el transporte y metabolismo de la glucosa –expresión del glucotransportador, captación de la hexosa, glucógeno sintasa  $\alpha$ , glucógeno y enzimas de señalización celular–, en tejidos extrapancreáticos involucrados en la homeostasis del azúcar.**

### **En el hígado...**

El tratamiento sostenido, tanto con GLP-1 como con Ex-4, incrementa y corrige el menor valor de expresión génica del GLUT-2 en ambos modelos, y también tiende a normalizar el contenido en glucógeno inicialmente reducido.

Si bien la PI3K y las MAPKs parecen mediar la acción del GLP-1 y Ex-4 en este tejido, el efecto normalizador de cada uno de estos péptidos en la rata resistente a insulina y diabética tipo 2, parece ocurrir a través de una vía de señalización post-receptor distinta.

### **En el músculo esquelético...**

Tanto el tratamiento con GLP-1 como con Ex-4, si bien ninguno modifica la sobreexpresión del glucotransportador GLUT-4 en ambos modelos, sí corrigen, hacia la normalización, los valores inicialmente reducidos tanto de transporte de glucosa como de actividad glucógeno sintasa  $\alpha$ .

El efecto normalizador del GLP-1 y la Ex-4 sobre el transporte de glucosa y actividad glucógeno sintasa  $\alpha$  en ambos modelos, cursa en paralelo con una normalización del valor inicialmente reducido en la actividad PI3K en el caso de la diabética, y de las MAPKs en los dos modelos, si bien en este último caso la acción respectiva del GLP-1 y Ex-4 no parecen incidir sobre la misma isoforma del enzima.

### **En el tejido adiposo...**

La alteración en la expresión del GLUT-4 en los dos modelos experimentales, que va acompañada de un transporte de glucosa disminuido en el de resistencia a insulina, y aumentado en el de diabetes tipo 2, y de una hiperactividad PI3K en ambos, se normaliza tras tratamiento con GLP-1 y Ex-4. Sin embargo, las dos isoformas de las MAP quinasas, que también están hiperactivadas en ambos modelos experimentales, sólo se ven corregidas, hacia su normalización, tras tratamiento con GLP-1.

**El hígado, músculo esquelético y tejido adiposo presentan, en estado de resistencia a insulina y diabetes tipo 2, alteraciones de parámetros propios del metabolismo del azúcar, bien en su captación, su señalización celular o**

metabolismo; tanto la Ex-4 como el GLP-1 tiene un efecto corrector en muchos de ellos, cuya consecución es llevada a cabo, no obstante, a través de un mecanismo post-receptor distinto. De estos tejidos extrapancreáticos, si bien la participación del hígado se muestra como primordial, los tres son diana en la acción de la Ex-4 y el GLP-1, conduciendo en conjunto, posiblemente, a la demostrada intervención de estos dos péptidos en el control de la homeostasis de la glucosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acitores A, González N, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2004) Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* 180: 389-98
- Alcántara AI, Morales M, Delgado E, López-Delgado MI, Clemente F, Luque MA, Malaisse WJ, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1997) Exendin-4 agonist and exendin(9-39)amide antagonist of the GLP-1(7-36)amide effects in liver and muscle. *Arch Biochem Biophys* 341:1-7
- Álvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blázquez E (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66: 920-7
- Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vazquez P, Maldonado A, de Caceres J, Desco M, Pozo MA, Blazquez E (2005) The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 92: 798-806
- Ambrosioni F (1835). *Ann Univ Med Chir* 74:160. Citado por Lépine R (1909) en, *Le diabète sucré*. Paris
- Arnés L, Tornero-Esteban P, Sancho V, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, (2008) GLUT-4 mRNA and protein content of soleus muscle and parametrial fat in  $\omega_3$  fatty acid-depleted rats. *Metab Funct Res Diab* 1: 7-9
- Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2009) Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parameters in rat liver and muscle, in normal and type 2 diabetic state. *Regul Pept* 153: 88-92
- Arnold TP, Standaert ML, Hernandez H, Watson J, Mischak H, Kazanietz MG, Zhao L, Cooper DR, Farese RV (1993) Effects of insulin and phorbol esters on MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) phosphorylation (and others parameters of protein kinase C activation) in rat adipocytes, rat soleus muscle and BC3H-1 myocytes. *Biochem J* 295: 155-64
- Baldissera FG, Holst JJ (1986) Glicentin 1-61 probably represents a major fraction of glucagon-related peptides in plasma of anaesthetized uraemic pigs. *Diabetologia* 29: 462-7
- Banting FG, Best CH (1922) Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canad Med Ass J* 12:141
- Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen N (1992) The insulin receptor activation process involves localized conformational changes. *J Biol Chem* 267: 23290-4
- Bataille D, Coudray AM, Carlqvist M, Rosselin G, Mutt V (1982) Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Isolation of the peptide. *FEBS Lett* 146: 73-8
- Beck-Nielsen H, Groop LC (1994) Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94: 1714-21
- Bell GI, Sánchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC (1983a) Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature* 304: 368-371
- Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT (1983b) Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302: 716-8
- Bernard C (1849) Chiens rendus diabétique. *CR Soc Biol* 1: 60
- Bernard C (1877) *Leçons sur le diabète et la glycogénèse animale*. Paris

- Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 54: 1640–8
- Bhavsar S, Watkins J, Young A (1998) Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiol Behav* 64: 557-61
- Blázquez E, Alvarez E, Navarro M, Roncero I, Rodríguez-Fonseca F, Chowen JA, Zueco JA (1998) Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. *Mol Neurobiol* 18: 157-73
- Bouchard A (1851). *Du diabète sucré ou glycosurie, son traitement hygiénique*. Paris
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Brichard SM, Desbuquois B, Girard J (1993a) Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes, and on glucose transporter GLUT2. *Mol Cell Endocrinol* 91: 91-7
- Brichard SM, Henquin JC, Girard J (1993b) Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism. *Diabetologia* 36: 292-8
- Brown GK (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23: 237-46
- Burcelin R, Eddokus M, Kande J, Assan R, Girard J (1992) Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. *Biochem J* 288: 675-9
- Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M (2001) Protein kinase C  $\zeta$  activation mediates glucagon-like peptide-1 induced pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Diabetes* 50: 2237-43
- Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M (2003) Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52: 124-32
- Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B (2001) Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 50: 1720–8
- Calvo JC, Gisolfi CV, Blázquez E, Mora F (1995a) Glucagon-like peptide-1(7-36)amide induces the release of aspartic acid and glutamine by the ventromedial hypothalamus of the conscious rat. *Brain Res Bull* 38: 435-9
- Calvo JC, Yusta B, Mora F, Blázquez E (1995b) Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J Neurochem* 64: 299-306
- Campos RV, Lee YC, Drucker DJ (1994) Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-64
- Cancelas J, Prieto PG, García-Arévalo M, Sancho V, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I (2008) Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose. *Horm Metab Res* 40: 459-66
- Cheatham B, Kahn CR (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16: 117-42
- Chen L, Alam T, Johnson JH, Hughes S, Newgard CB, Unger RH (1990) Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4088-92

- Chen YE, Drucker DJ (1997) Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem* 272: 4108-15
- Christel CM, DeNardo DF, Secor SM (2007) Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). *J Exp Biol* 210: 3430-9
- Conlon JM (1988) Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles. *Diabetologia* 31: 563-8
- Cullen W (1769) *Synopsis nosologiae methodicae*. vol. 62, pg: 188-91. Edinburgh, Scotland
- Cushman SW, Wardzala LJ (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255:4758-62
- Czech MP (1985) The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Ann Rev Physiol* 47: 357-81
- D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensink JV (1994) Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J Clin Invest* 93: 2263-6
- D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensink JW (1995) Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes: A physiologic role of Glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 44: 1433-7
- D'Alessio D, Vahl T, Prigeon R (2004) Review: Effects of glucagon-like peptide 1 on the hepatic glucose metabolism. *Horm Metab Res* 36: 837-41
- Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD (2004) Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E75-E81
- Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ (1995) Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 952-7
- Delgado E, Luque MA, Alcántara A, Trapote M, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16, 225-9
- De Wulf H, Hers HG (1968) The interconversion of liver glycogen synthetase a and b in vitro. *Eur J Biochem* 6: 552-7
- Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ (1996) Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 334: 952-7.
- Dhavantani S, Seidah NG, Brubaker PL (1996) Role of prohormone convertases in this tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol* 10: 342-55
- Dombrowski F, Filsinger E, Bannasch P, Pfeifer U (1996) Altered liver acini induced in diabetic rats by portal vein islet isografts resemble preneoplastic hepatic foci in their enzymic pattern. *Am J Pathol* 148: 1249-56
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434-8
- Drucker DJ (2003) Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol* 17: 161-71

- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173-9
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauster E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, Rutter WJ (1985) The human insulin receptor cDNA: the structural basis of hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747-58
- Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei M (1999) Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9–39. *Diabetes* 48: 86–93
- Egan JM, Montrose-Rafizadeh CH, Wang Y, Bernier M, Roth J (1994) Glucagon-like peptide-1(7-36)amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: One of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology* 135: 2070-5
- Egan JM, Clocquet AR, Elahi D (2002) The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1282-90
- Einhorn D, Aroda VR, Henry RR (2004) Glitazones and the management of insulin resistance: what they do and how might they be used. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33: 595-616
- Elahi D, McAlbon-Dike M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK (1994) The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* 51: 63-74
- Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 138: 159-66
- Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267: 7402-5
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?. *Diabetes* 52: 1-8
- Faulkner A, Pollock HT (1991) Effect of truncated glucagon-like peptide-1 on the responses of starved sheep to glucose. *J Endocrinol* 129: 55-8
- Fehmann HC, Habener JF (1992) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma  $\beta$ TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-66
- Fehse F, Trautmann M, Holst JJ, Halseth AE, Nanayakkara N, Nielsen LL, Fineman MS, Kim DD, Nauck MA (2005) Exenatide augments first- and second-phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11): 5991-7
- Fleig WE, Noether-Fleig G, Fussgaenger R, Ditschuneit H (1984) Modulation by a sulfonylurea of insulin-dependent glycogenesis, but not of insulin binding, in cultured rat hepatocytes. *Diabetes* 33: 285-90
- Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998) Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101: 515-20
- Frank JP (1794) *Diabetes. Curandis Hominum Morbis Epitome*. pg: 38-67. Mannheim, Germany

- Frevert EU, Kahn BB (1997) Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17: 190-8
- Fukase N, Igarashi M, Takahashi H, Manaka H, Yamatani K, Daimon M, Tominaga M, Sasaki H (1993) Hypersecretion of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in obese patients. *Diabetic Med* 10: 44-9
- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transport expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264: 7776-9
- Gale EAM (2006) Troglitazone: the lesson that nobody learnt?. *Diabetologia* 49: 1-6
- Galera C, Clemente F, Alcántara A, Trapote MA, Perea A, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 myocytes. *Cell Biochem Funct* 14: 43-8
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:106-10
- Göke R, Conlon JM (1988) Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol* 116: 357-62
- Göke R, Trautmann ME, Haus E, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B (1989) Signal transmission after GLP-1 (7-36)amide binding in RINm5F cells. *Am J Physiol* 257: 397-401
- Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J (1993a) Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1 (7-36)-amide receptor of insulin-secreting  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 268: 19650-5
- Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Göke B (1993b) Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)* 193: 97-103
- Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP (1995) Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci* 7: 2294-300,
- Goodyear LJ, Hirshman M, Napoli R, Calles J, Markuns JF, Ljungqvist O, Horton ES (1996) Glucose ingestion causes GLUT4 translocation in human skeletal muscle. *Diabetes* 45: 1051-6
- Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM (1999) Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42: 45-50
- González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005a) Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signaling in human myocytes. *Regul Pept* 126: 203-11
- González N, Sancho V, Martin-Duce A, Tornero-Esteban P, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005b) GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients. *Int J Mol Med* 16: 747-52
- Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-45
- Guma, A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A (1991) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268: E613-22



- Gutniak M, Ørskov C, Holst JJ, Ahren B, Effendic S (1992) Antidiabetogenic effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *New Engl J Med* 326: 1316-22
- Gutniak M, Linde B, Holst JJ, Effendic S (1994) Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 abolishes postprandial glycemia in NIDDM. *Diabetes Care* 17: 1039-44
- Gutniak M, Larsson H, Sanders SW, Juneskans O, Holst JJ, Ahren B (1997) GLP-1 tablet in type 2 diabetes in fasting and postprandial conditions. *Diabetes Care* 20: 1874-79
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol* 25: 1375-84
- Herrera R, Rosen OM (1986) Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro: designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. *J Biol Chem* 261: 11980-5
- Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-26
- Hirota M, Hashimoto M, Hiratsuka M, Ohbosh C, Yoshimoto C, Yano M, Mizuno A, Shima K (1990) Alterations of plasma immunoreactive glucagon-like peptide-1 behavior in non-insulin-dependent diabetics. *Diabetes Res Clin Pr* 9: 179-85
- Holst JJ, Ørskov C, Nielsen OV, Schwartz TW (1987) Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett* 211: 169-74
- Holst JJ, Deacon CF (1998) Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-70
- Idris I, Patiag D, Gray S, Donnelly R. (2002) Exendin-4 increases insulin sensitivity via a PI-3-Kinase-dependent mechanism: contrasting effects of GLP-1. *Biochem Pharmacol* 63: 993-6
- Iltz JL, Baker DE, Setter SM, Keith Campbell R (2006) Exenatide: an incretin mimetic for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 28: 652-65
- Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM (2003) Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol Cell Biol* 23: 4892-900
- Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcosohn J, Klip A, Skolnik EY (1995) The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10247-51
- Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME (2005) Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens* 23: 463-73
- Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerstrom C, Andersson A (1995) Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 96: 721-6
- Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, O'Hara PJ, Foster D, Walker KM, Chen LH, McKernan PA, Kindsvogel W (1993) Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259: 1614-6
- Jin T, Drucker DJ Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein cdx 2/3. *Mol Cell Biol* 16: 19-28

- Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger RH (1990) Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* 250: 546-9
- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 201-5
- Kahn BB (1996) Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45: 1644-54
- Kandror KV, Pilch PF (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol* 271: E1-14
- Katsoyannis PG, Tometsko A, Fukuda K (1963) Insulin peptides IX: the synthesis of the A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. *J Am Chem Soc* 85: 2863-70
- Kawai K, Suzuki S, Ohashi S, Mukai M, Ohmori H, Murayama Y, Yamashita K (1989) Comparison of the effects of glucagon-like peptide-1-(1-37) and -(7-37) and glucagon on islet hormone release from isolated perfused canine and rat pancreases. *Endocrinology* 124: 1768-73
- Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263: 15245-8
- Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-56
- Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585-96
- Knapper JM, Heath A, Fletcher JM, Morgan LM, Marks V (1995) GIP and GLP-1(7-36)amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients in pigs. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 111: 445-50
- Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD (2003) Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3082-9
- Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, Tauri S (1989) Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagon-like peptide 1-(7-37)-amide. *Diabetes* 38: 902-5
- Koranyi L, Bourey RE, Turk J, Mueckler M, Permutt MA (1992) Differential expression of rat pancreatic islet beta-cell glucose transporter (GLUT2), proinsulin and islet amyloid polypeptide genes after prolonged fasting, insulin-induced hypoglycaemia and dexamethasone treatment. *Diabetologia* 35: 1125-32
- Kreymann B, Williams G, Gathe MA, Bloom SR (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* II: 1300-3
- Kreymann B, Yiangon Y, Kanse S, Williams G, Gathe MA, Bloom SR (1988) Isolation and characterization of GLP-1(7-36)amide from rat intestine. *FEBS Lett* 242: 167-70
- Lancereaux E (1880) Le diabète maigre, ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement. *Union Médicale* 3: 29, 161-7, 205-11
- Langerhans P (1869) *Beiträge zur Mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse*. Diss Med. Berlin, Germany

- Lankat-Buttgereit B, Göke R, Fehmann HC, Richter G, Göke B (1994) Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. *Exp Clin Endocrinol* 102: 341-7
- Larsen PJ, Holst JJ (2005) Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter. *Regul Pept* 15: 97-107
- Laser B, Meda P, Constant I, Philippe J (1996) The caudal-related homeodomain protein cdx 2/3 regulates glucagon gene expression in islet cells. *J Biol Chem* 271: 28984-94
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 1988-92
- Litherland GJ, Hajdуч E, Hundal HS (2001) Intracellular signaling mechanism regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol Membr Biol* 18: 195-204
- López LC, Frazier ML, Su C, Kumar A, Saunders GF Mammalian pancreatic preproglucagon contains three glucagon-related peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5485-9
- Lugari R, Dell'Anna C, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Zandomenighi R, Marani B, Iotti M, Orlandini A, Gnudi A (2000) Effect of nutrient ingestion on glucagon-like-peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 32: 424-8
- Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5817-21
- Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2002) GLP-1 and glucose metabolism in human myocytes. *J. Endocrinol* 173: 183-9
- Marger MD, Saier MH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20
- Márquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1998) Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochem Funct* 16: 51-6
- Márquez L, González N, Puente J, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2001) GLP-1 effect upon the GIP/IPG system in adipocytes and hepatocytes from diabetic rats. *Diab Nutr Metab* 14: 239-44
- Mérida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1993) Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1654-7
- Mering J, Minkowski O (1890) *Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation*. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 26: 371-87
- Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Beck-Nielsen H, Klein HH (2002) Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* 45: 813-22
- Miki H, Namba M, Nishimura T, Mineo I, Matsumara T, Miyagawa J, Nakajima H, Kuwajima M, Hanafusa T, Matsuzawa Y (1996) Glucagon-like peptide-1(7-36)amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1312: 132-6
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986) Preproglucagon gene expression in páncreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261: 11880-9

- Montrose-Rafizadeh CH, Avdonin P, Garant MJ, Rodgers BD, Kole S, Yang H, Levine MA, Schwindinger W, Bernier M (1999) Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 140: 1132-40
- Mora F, Expósito I, Sanz B, Blázquez E (1992) Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1(7-36)amide in the basal ganglia of the conscious rat. *Brain Res Bull* 29: 359-61
- Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, Puente J, Viñambres C, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) Preserved GLP-1 effects upon glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes* 46: 1264-9
- Namba M, Itoh H, Watanabe N, Kono N, Komatsu R, Matsuyama T, Hirota M, Shima K, Tauri S (1990) Multiple forms of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like immunoreactivities in canine gastrointestinal tract and their release into circulation. *Biomed Res* 11: 247-54
- Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF (1992) Insulinotropic action of glucagon-like peptide-1(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 15: 270-6
- Nauck M, Bartels E, Ørskov C, Ebert R, Creutzfeldt W (1993a) Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide infused at near physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 912-7
- Nauck M, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993b) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide), but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 301-7
- Nauck MA, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W (1993c) Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1(7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 36: 741-4
- Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, Eng J, Blázquez E (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67, 1982-91
- Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapía S, R. Caeiro J, Cancelas J, Haro-Mora J, Villanueva-Peñacarrillo ML (2009) Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic and insulin-resistant states. *Calcified Tissue Int* 84: 453-61
- Nuche-Berenguer B, Moreno P, Gonzalez N, Acitores A, Portal-Núñez, S, Esbrit, P, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2010a) Characterization of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 225(2): 585-92
- Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Núñez S, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2010b) Exendin-4 exerts osteogenic actions in type 2 diabetic and insulin resistant states. *Regul Pept* 159: 61-6
- Oben J, Morgan L, Fletcher J, Marks V (1991) Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *J Endocrinol* 130: 267-77
- O'Halloran DJ, Nikou GC, Kreymann B, Ghatei MA, Bloom SR (1990) Glucagon-like peptide-1(7-36)NH<sub>2</sub>: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J Endocrinol* 126: 169-73

- O'Harte FP, Gray AM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR (1997) Effects of non-glycated and glycated glucagon-like peptide-1(7-36)amide on glucose metabolism in isolated mouse abdominal muscle. *Peptides* 18: 1327-33
- Opie LH (2007) Metabolic Syndrome. *Circulation* 115: 32-5
- Orci L, Ravazzola M, Baetens D, Imnan L, Amherdt M, Peterson RG, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH (1990a) Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9953-7
- Orci L, Unger RH, Ravazzola M, Ogawa A, Komiya I, Baetens D, Lodish HF, Thorens B (1990b) Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J Clin Invest* 86: 1615-22
- Ørskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV (1986) Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 119: 1467-75
- Ørskov C, Holst JJ (1987) Radioimmunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scand J Clin Lab Invest* 47: 165-74
- Ørskov C, Nielsen JH (1988) Truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide), an intestinal insulin-releasing peptide, has specific receptors on rat insulinoma cells (RIN 5AH). *FEBS Lett* 229: 175-8
- Ørskov C, Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Holst JJ (1989) Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J Biol Chem* 264: 12826-9
- Ørskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ (1991) Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J Clin Invest* 87: 415-23
- Ørskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Holst JJ (1994) Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* 43: 535-9
- Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A (2001) Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism* 50: 583-9
- Perea A, Viñambres C, Clemente F, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) GLP-1(7-36)amide effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 29: 417-21
- Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2002) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 881-8
- Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2003) Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (Aβ) levels and protects hippocampal neurons from death induced by Aβ and iron. *J Neurosci Res* 72: 603-12
- Philippe J, Mojsov S, Drucker D, Haberner JF (1986) Proglucagon processing in a rat islet cell line resembles phenotype of intestine rather than pancreas. *Endocrinology* 119: 2833-9
- Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371-7
- Pulido N, Romero R, Suárez AI, Rodríguez E, Casanova B, Rovira A (1996) Sulfonylureas stimulate glucose uptake through GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 499-504

- Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeldt W (1995) Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [7-36 amide] in the fasting state in healthy subjects. *Acta Diabetol* 32: 13-6
- Rangwala SM, Lazar MA (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25: 331-6
- Raufman JP, Singh L, Singh G, Eng J (1992) Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4. *J Biol Chem* 267: 21432-7
- Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M (2001) Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 24: 371-81 Review
- Redondo A, Trigo MV, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2003) *Cell signaling of the GLP-1 action in rat liver. Mol Cell Endocrinol* 204: 43-50
- Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-80
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Álvarez E, Roncero I, Chown JA, Maestre O, Gómez R, Muñoz RM, Eng J, Blázquez E (2000) Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49: 709-17
- Rothenberg ME, Eilertson CD, Klein K, Zhou Y, Lindberg I, McDonald JK, Mackin RB, Noe BD (1995) Processing of mouse proglucagon by recombinant prohormone convertase 1 and immunopurified prohormone convertase 2 in vitro. *J Biol Chem* 270: 10136-46
- Roy D, Johannsson E, Bonen A, Marette A (1997) Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273: E688-94
- Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I (1992) Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13: 13-6
- Sancho V, Trigo MV, González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 35: 27-38
- Sancho V, Trigo MV, Martín-Duce A, González N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2006) Effect of GLP-1 on D-glucose transport, lipolysis and lipogenesis in adipocytes of obese subjects. *Int J Mol Med* 17: 1133-7
- Sancho V, Nuche B, Arnés L, Cancelas J, González N, Díaz-Miguel M, Martín-Duce A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2007) The action of GLP-1 and exendins upon glucose transport in normal human adipocytes, and on kinase activity as compared to morbidly obese patients. *Int J Mol Med* 19: 961-6
- Sanger F (1959) Chemistry of insulin. *Science* 29:1340-4
- Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, Barrio PA, Álvarez MM, Blázquez E (2010) Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3): E634-43
- Schjoldager BT, Mortensen DE, Christiansen J, Ørskov C, Holst JJ (1989) GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibits gastric acid secretion in man. *Digest Dis Sci* 34: 703-8
- Seino S, Welsh M, Bell GJ, Chan SJ, Steiner DF (1986) Mutation in the guinea-pig preproglucagon gene are restricted to a specific portion of the prohormone sequence. *FEBS Lett* 203: 25-30

- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490
- Shima K, Hirota M, Ohboshi C (1988) Effect of glucagon-like peptide-1 on insulin secretion. *Regul Pept* 22: 245-52
- Shipp J, Opie LH, Challoner DR (1961) Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. *Nature* 189: 1018-9
- Siegel EG, Schulze A, Schmidt WE, Creutzfeldt W (1992) Comparison of the effect of GIP and GLP-1(7-36amide) on insulin release from rat pancreatic islets. *Eur J Clin Invest* 22: 154-7
- Smith SR (1996) The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25: 921-42
- Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue?. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 897-904
- Suzuki S, Kawai K, Ohashi S, Mukai H, Yamashita K (1989) Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 125: 3109-14
- Suzuki K, Kono T (1993) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2452-5
- Syvanne M, Taskinen MR (1997) Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 (suppl 1): S120-3
- Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM (2000) Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141: 1936-41
- Taha C, Klip A (1999) The insulin signalling pathway. *J Membr Biol* 169: 1-12
- Takahashi H, Manaka H, Suda K, Fukase N, Sekikawa A, Eguchi H, Tominaga M, Sasaki H (1991) Hyperglycaemia but not hyperinsulinaemia prevents the secretion of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) stimulated by fat ingestion. *Scand J Clin Lab Inv* 51: 499-507
- Tal M, Khan BB, Lodish HF (1991) Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology* 129: 1933-41
- Thim L, Moody AJ (1982) Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (pro-glucagon fragment) from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta* 703: 134-41
- Thorens B, Sarkar MK, Kaback HR, Lodish HF (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islets. *Cell* 55: 281-90
- Thorens B, Flier JS, Lodish HF, Kahn BB (1990a) Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment. *Diabetes* 39: 712-9
- Thorens B, Weir GC, Leahy JL, Lodish HF, Bonner WS (1990b) Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6492-6
- Thorens B (1992) Expression cloning of the pancreatic beta-cell receptor for the glucocretin hormone glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8641-5

- Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widmann C (1993) Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor: demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin(9–39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42:1678–82
- Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK (2001) Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717-23
- Torres MD, Tormo MA, Campillo C, Carmona MI, Torres M, Reymundo M, García P, Campillo JE (2008) Etiologic and cardiovascular risk factors in obese children from Extremadura in Spain. Their relationship with insulin resistance and plasma adipocytokine levels. *Rev Esp Cardiol* 61(9): 923-9
- Tourrel C, Bailbé D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2001) Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 50: 1562-70
- Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51: 1443-52
- Trapote MA, Clemente F, Galera C, Morales M, Alcántara AI, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositol-phosphoglycans are possible mediators of the glucagon-like peptide-1(7-36)amide action in the liver. *J Endocrinol Invest* 19: 114-8
- Turner NC, Clapham JC (1998) Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res* 51: 33-94
- Turton M.D, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Tylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatei M A, Herbert J, Bloom SR (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-61
- Unger RH, Ohneda A, Valverde I, Eisentraut AM, Exton J (1968) Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose. *J Clin Invest* 47: 48-65
- Unger RH (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 251: 1200-5
- Uttenthal LO, Blázquez E (1990) Characterization of the gastric receptor for truncated glucagon-like peptide-1 in the rat. *FEBS Lett* 262: 139-41
- Uttenthal LO, Toledano A, Blázquez E (1992) Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide in rat brain. *Neuropeptides* 21: 143-6
- Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, Ellis KS, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, D'Alessio DA (2007) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148: 4965–73
- Valverde I, Rigopoulou D, Marco J, Faloona GR, Unger RH (1970) Characterization of glucagon-like immunoreactivity (GLI). *Diabetes* 19: 614-23
- Valverde I, Barreto M, Malaisse WJ (1988) Stimulation by D-glucose of protein biosynthesis in tumoral insulin-producing cells (RINm5F line). *Endocrinology* 122: 1443-8



- Valverde I, García S, Ruiz-Grande C, Furundarena E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML (1991) GLP-1(7-36)amide: characterization of its binding to specific receptors in normal and tumoral rat islet cells. *Biomed Res* 12: 263-7
- Valverde I, Mérida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML (1993) Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 132: 75-9
- Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML (1994) Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Letters* 349: 313-6
- Valverde I, Puente J, Martin-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg* 15: 387-97
- Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard Madsen J, Juul Holst J, Astrup A (2001) The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety-effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1206-14
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Alcántara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I (1994a) Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 37: 1163-6
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, Valverde I (1994b) Increased glucagon-like peptide 1 (7-36)amide binding in adipose tissue from non-insulin dependent and insulin-dependent diabetic patients. *Diab Nutr Metab* 7: 143-8
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol* 146: 183-9
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Márquez L, González N, Díaz-Miguel M, Valverde I (2001a) Effect of GLP-1 on lipid metabolism in human adipocytes. *Horm Metab Res* 33: 73-7
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I (2001b) Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 15: 241-8
- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M (2004) Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem* 11: 795-805
- Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609-13
- Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM (1997a) Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* 19: 241-8
- Wang Y, Perfetti R, Greig NH, Holloway HW, DeOre KA, Montrose-Rafizadeh C, Elahi D, Egan JM (1997b) Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest* 99: 2883-9
- Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS (1994) Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135: 649-54
- Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993) Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in human. *Digest Dis Sci* 38: 665-73

- Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng WH, Chen CH, Boyd AE (1993) Functional expression of the rat glucagon-like peptide-1 receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology* 133: 57-62
- Willis T (1674) De diuresi nimia, ejusque remedio, et speciatum de Diabete, in cujus theoriā, et therapiā inquitur. *Pharmaceutice Rationalis Sive Diatraba de Medicamentorum Operationibus in Humano Corpore*. sec. 4, cap. 3: 163-82. London
- Willms B, Werner J, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA (1996) Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1-(7-36)amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 327-32
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-6
- Yanaihara C, Matsumoto T, Hong YM, Yanaihara N (1985) Isolation and characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas. *FEBS Lett* 189: 50-6
- Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C (1998) GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Am J Physiol* 275: 675-83
- Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48: 1026-34
- Young AA (2002) Glucagon-like peptide-1, exendin and insulin sensitivity. En, *Insulin Resistance and Insulin Resistance Syndrome*. Ed.: Hansen B, Shafir E. Harwood Academic, New York. pg: 235-62
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thodis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* 264: 12358-63

## ABREVIATURAS

ADN .....	ácido desoxirribonucleico
AGL.....	ácido graso libre
AGNE.....	ácido graso no esterificado
Akt.....	proteína quinasa B
AMPc .....	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA .....	análisis de la varianza
ATP.....	adenosín trifosfato
ARN .....	ácido ribonucleico
BSA.....	albúmina de suero bovina
Ci.....	curio
DPP-IV.....	dipeptidil peptidasa
DT2 .....	modelo diabetes tipo 2 generado con streptozotocina al nacer
EDTA .....	ácido etilén-diaminotetraacético
EEM.....	error estándar de la media
EGTA .....	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK.....	quinasas reguladas extracelularmente
Ex-4.....	exendina 4
Ex-9.....	exendina 9
GHRH .....	hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GIP .....	péptido secretor de insulina dependiente de glucosa
GLP.....	glucagon-like peptide
GLUT .....	transportador de glucosa
GRPP.....	péptido pancreático relacionado con la glicentina
GSa.....	glucógeno sintasa α
HDL.....	lipoproteína de alta densidad
HEPES.....	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]-etanosulfónico
IgG .....	inmunoglobulina G
IPG.....	inositolfosfoglicano
IRS .....	sustrato del receptor de insulina
K.....	coeficiente de utilización de glucosa
kDa.....	kiloDalton
KRB.....	tampón Krebs Ringer bicarbonato
LDL.....	lipoproteína de baja densidad
LSD.....	Least Significant Differences
M.....	molaridad
MAPK.....	proteínas quinasas mitogénicamente activas
MPGF.....	fragmento mayor del proglucagón
N.....	normal
P.....	probabilidad
p70s6k .....	proteína quinasa ribosomal de 70 kDa
PI3K.....	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP <sub>2</sub> .....	fosfatidilinositol 2-fosfato
PIP <sub>3</sub> .....	fosfatidilinositol 3-fosfato
PKB .....	proteína quinasa B
PKC.....	proteína quinasa C
PMSF .....	fluoruro de fenilsulfonilmetano
PP-1 .....	proteína fosfata 1

PP-2.....	proteína fosfatasa-2A
PPAR-γ.....	receptor nuclear gamma activado por proliferadores de peroxisoma
PTH.....	hormona paratiroidea
Rab4.....	proteína 4 vinculada con Ras
RI.....	resistencia a insulina
SDS.....	dodecil sulfato sódico
SPSS.....	Statistical Package for the Social Science
STZ.....	estreptozotocina
TBS.....	tampón tris-salino
TBS-LD.....	tampón tris-salino con leche desnatada
TBS-T.....	tampón tris-salino con Tween-20
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetra metil-etilendiamida
TLC.....	cromatografía en capa fina
TNF-α.....	factor de necrosis tumoral α
UIC.....	unidades inhibitoras de calicreína
VIP.....	péptido intestinal vasoactivo
Δ.....	incremento